



Tratamiento de la disfunción mitocondrial con coenzima Q₁₀

Mario de la Mata Fernández

2015



Centro
Andaluz
de Biología
del Desarrollo



**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR
CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO-CSIC
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE**

Tratamiento de la disfunción mitocondrial con coenzima Q₁₀

Mario de la Mata Fernández

Sevilla, 2015



Centro
Andaluz
de Biología
del Desarrollo



D. JOSÉ ANTONIO SÁNCHEZ ALCÁZAR, DOCTOR EN MEDICINA POR LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Y PROFESOR TITULAR DEL ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE DE SEVILLA

INFORMA

que **D. MARIO DE LA MATA FERNÁNDEZ**, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **TRATAMIENTO DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL CON COENZIMA Q₁₀** y que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, firmo el presente en Sevilla, a de septiembre de 2015



Centro
Andaluz
de Biología
del Desarrollo



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR
CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO-CSIC
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

Tratamiento de la disfunción mitocondrial con coenzima Q₁₀

TESIS DOCTORAL

Mario de la Mata Fernández

Director Dr. José Antonio Sánchez Alcázar

Sevilla, 2015

AGRADECIMIENTOS

A José Antonio por su ayuda y ánimo constante.

Al Colegio de Farmacéuticos de Sevilla (COF), que me concedió una beca para realizar un estudio sobre enfermedades mitocondriales.

A la Fundación Española de Enfermedades Lisosomales (FEEL), que me concedió una beca para realizar un estudio sobre enfermedades lisosomales.

A, Antonio Gonzales Meneses, Ana Paula, Juanjo.

A, David, Chelo y sus colaboradores de Genzyme, por los buenos momentos y las invitaciones a las reuniones anuales sobre la enfermedad de Gaucher.

A, todos mis compañeros de laboratorio, David, Manuel, Juan, Marina, Ana, Isa, Mónica.

A, Emilio, Manu y especialmente a Dani por su ayuda con la docencia.

A, Antonio, un buen tío, dispuesto siempre a pagar los desayunos.

A la Junta de Andalucía, que me concedió una beca PIF.

A Carmen y José Manuel por su inestimable ayuda.

A mis padres y hermanos.

Muchas Gracias.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada dentro del programa de doctorado Biotecnología y Tecnología Química, Grupo de Investigación de Fisiopatología celular en el Desarrollo y la Enfermedad en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular de la Universidad Pablo de Olavide y bajo la dirección del Dr. José Antonio Sánchez Alcázar gracias a la financiación del proyecto de investigación de excelencia CTS-5725 de la Junta de Andalucía. El trabajo del doctorando ha sido financiado por una beca predoctoral de personal investigador en formación asociada al proyecto de investigación CTS-5725 de la Junta de Andalucía.

ÍNDICE

1. LISTADO DE ABREVIATURAS	1
2. RESUMEN	4
3. OBJETIVOS	9
4. INTRODUCCIÓN	11
4.1. Disfunción mitocondrial	21
4.2. Tratamiento de la disfunción mitocondrial; Coenzima Q ₁₀	30
4.3. Coenzima Q ₁₀	33
4.4. Disfunción mitocondrial primaria: Síndrome MERRF	41
4.5. Síndrome MERRF	45
4.6. Disfunción mitocondrial secundaria: la enfermedad de Gaucher	48
4.7. La enfermedad de Gaucher	50
4.8. Chaperonas farmacológicas	55
5. MATERIAL Y MÉTODOS	56
5.1. Reactivos	57
5.2. Líneas celulares	58
5.3. Extracción de coenzima Q ₁₀ de los cultivos celulares	59
5.4. Determinación de los niveles de coenzima Q ₁₀ por HPLC	60
5.5. Análisis enzimático de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial	60
5.5.1. Preparación de las células para dosificación de cadena respiratoria mitocondrial	60
5.5.2. Determinación de proteínas para dosificación de actividad de Cadena respiratoria mitocondrial por método de Lowry modificado	61
5.5.3. Análisis enzimático de actividad de cadena respiratoria mitocondrial a partir de homogenado de células	61
5.5.3.1. Citrato Sintasa	61
5.5.3.2. Complejo I-NADH CoQ Oxidorreductasa	62
5.5.3.3. Complejo II-Succinato deshidrogenasa	62
5.5.3.4. Complejo III: DBH2-Citocromo C Oxidorreductasa	63
5.5.3.5. Complejo I+III: NADH-Citocromo C-Reductasa	63
5.5.3.6. Complejo II+III: Succinato-Citocromo C-Reductasa	64
5.6. Análisis de proteínas por Western-Blotting	64
5.6.1. Extracción y cuantificación de proteínas por el método de Bradford	64
5.6.2. SDS-PAGE y Western-Blotting	65
5.6.3. Cuantificación de los niveles de glucosilceramida: Dot-Blotting	66
5.6.4. Inmunodetección con anticuerpos y electrotransferencia de proteínas	66
5.7. Determinación de los niveles de ATP	67
5.8. Estudio del $\Delta\Psi_m$ y cuantificación de mitocondrias despolarizadas	67
5.9. Microscopía de fluorescencia y estudios de colocalización	68
5.10. Estudios de deconvolución, Z-Stacks	69
5.11. Cuantificación de la tasa de proliferación celular	69
5.12. Cuantificación de células apoptóticas	70
5.13. Cuantificación de la producción de ROS mitocondriales	70
5.14. Cuantificación de los niveles intracelulares de H ₂ O ₂	71
5.15. Determinación de la peroxidación lipídica	71
5.16. Cuantificación de las vacuolas ácidas	72

5.17. Determinación de actividad de la β -galactosidasa ácida	72
5.18. Actividad enzimática de la β -glucocerebrosidasa	72
5.19. Determinación de expresión mRNA: PCR Tiempo Real	73
5.20. Tratamiento con Endoglicosidasa-H	75
5.21. Síntesis de la chaperona farmacológica NADBT-AIJ	75
5.22. Análisis estadístico	76

6. RESULTADOS **77**

Tratamiento con coenzima Q₁₀ en modelos celulares de la enfermedad de MERRF **78**

6.1. Efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ sobre la disfunción mitocondrial primaria en fibroblastos derivados de pacientes MERRF. **79**

6.1.1. Efecto del tratamiento con coenzima Q ₁₀ sobre el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).	81
6.1.2. Efecto del tratamiento con coenzima Q ₁₀ sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales.	83
6.1.3. Efecto del tratamiento con coenzima Q ₁₀ sobre la peroxidación lipídica.	84

6.2. Autofagia en fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF. **86**

6.2.1. Efecto del tratamiento con coenzima Q ₁₀ sobre la actividad β -galactosidasa ácida.	88
6.2.2. Efecto del tratamiento con coenzima Q ₁₀ sobre la degradación mitocondrial por autofagia.	89
6.2.3. Confirmación de la selectividad autofágica de mitocondrias disfuncionales por mitofagia.	94

6.3. Efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ sobre las alteraciones fisiopatológicas en 3 líneas de fibroblastos MERRF con la mutación 8344A>G. **96**

6.4. Estudio de cíbridos transmitocondriales portadores de la mutación MERRF 8344A>G. **99**

Tratamiento con coenzima Q₁₀ y la chaperona farmacológica NADBT-AIJ en modelos celulares de la enfermedad de Gaucher. **106**

6.5. Disfunción mitocondrial secundaria en fibroblastos de pacientes Gaucher. **108**

6.5.1. Estudio de la función mitocondrial en fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Gaucher.	108
6.5.2. Determinación actividad de la enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial y el contenido de CoQ ₁₀ .	108
6.5.3. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).	109
6.5.4. Determinación de los niveles de ATP.	112

6.8. Efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ y NAdBT-AIJ sobre la disfunción mitocondrial secundaria en fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Gaucher	113
6.8.1.Efecto del tratamiento combinado coenzima Q ₁₀ y NAdBT-AIJ sobre el potencial de membrana mitocondrial y los niveles intracelulares de ATP.	113
6.8.2.Efecto del tratamiento con coenzima Q ₁₀ y NAdBT-AIJ sobre la proliferación celular.	116
6.8.3. Efecto del tratamiento con CoQ y NAdBT-AIJ sobre la red mitocondrial.	117
6.8.4.Efecto de la inhibición de la β-glucocerebrosidasa y la adición exógena de glucosilceramida sobre la función mitocondrial.	119
6.8.5.Efecto del tratamiento con coenzima Q ₁₀ y NAdBT-AIJ sobre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).	121
6.9. Autofagia en fibroblastos derivados de pacientes con la enfermedad de Gaucher	125
6.9.1.Efecto del tratamiento con coenzima Q ₁₀ y NAdBT-AIJ sobre la degradación selectiva de mitocondrias por autofagia.	130
6.9.2. Confirmación de la selectividad autofágica de mitocondrias disfuncionales por mitofagia.	132
6.9.3. Estudio del flujo autofágico lisosomal.	134
6.9.4. La autofagia ejerce un mecanismo protector en la enfermedad de Gaucher.	136
6.10.Efecto de coenzima Q₁₀ y NAdBT-AIJ sobre la actividad enzimática Glucocerebrosidasa y su tráfico hasta los lisosomas	138
6.10.1. Determinación de la actividad enzimática de la β-glucocerebrosidasa.	138
6.10.2. Efecto del tratamiento con coenzima Q ₁₀ y NAdBT-AIJ sobre la actividad enzimática y la expresión proteica de la glucocerebrosidasa.	139
6.10.3. Efecto del tratamiento con coenzima Q ₁₀ y NAdBT-AIJ sobre el tráfico de la glucocerebrosidasa hasta el lisosoma.	142
6.11. Efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ y NAdBT-AIJ sobre los niveles de glucosilceramida.	145
6.11.1. Efecto del tratamiento combinado coenzima Q ₁₀ y NAdBT-AIJ sobre la acumulación de glucosilceramida en el compartimento lisosomal y mitocondrial.	146
7. DISCUSIÓN	150
8. CONCLUSIONES	163
9. PUBLICACIONES y PATENTES	166
10.BIBLIOGRAFÍA	169

1. LISTADO DE ABREVIATURAS

1. LISTADO DE ABREVIATURAS

ADP:	Adenosín difosfato
AMPK:	Kinasa activada por AMP
AMP:	Adenosín monofosfato
ATG:	Gen relacionado con la autofagia
Atg:	Proteína relacionada con la autofagia
ATP:	Adenosín trifosfato
BAF:	Bafilomicina A1
CBE:	Conduritol beta epóxido
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico complementario
CF:	Chaperona farmacológica o NAdBT-AIJ
CoQ :	Coenzima Q ₁₀
CRM:	Cadena respiratoria mitocondrial
CS:	Citrato Sintasa
CTE:	Cadena de transporte electrónico
DCPIP:	2,6-Dicloroindofenol sodio hidratado
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DO:	Densidad óptica
DS:	Desviación estándar
DTNB:	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
EDTA:	Ácido etilendiamino tetraacético
EG:	Enfermedad de Gaucher
Endo-H:	Endoglicosidasa H
ERAD:	Degradación asociada al retículo endoplasmático
ETF:	Flavoproteína de transporte de electrones
ETFDH:	Flavoproteína deshidrogenasa de transporte de electrones
FAD:	Flavín adenín dinucleótido
FADH2:	Forma reducida del dinucleótido deflavina-adenina (FAD)
FBS:	Suero fetal de origen bovino
FMN:	Flavín mononucleótido
GADPH:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GCasa:	β-Glucocerebrosidasa
GlcCer:	Glucosilceramida
GlsSph:	Glucosilesfingosina
H₂O₂:	Peróxido de hidrógeno
HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HRP:	Peroxidasa de rábano (del inglés horseradish peroxidase)
IgG:	Inmunoglobulina G
LC3:	Microtubule-associated proteins (MAP) light chain 3-like protein 1
MEF:	Fibroblastos embrionarios de ratón
MERRF:	Epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas
MPT:	Transición de permeabilidad mitocondrial
MPTP:	Poro de Transición de permeabilidad mitocondrial
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero

mtDNA:	DNA mitocondrial
MTG:	Mitotracker Green FM
NAD⁺:	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NAdBT-AIJ:	N-[N'-(4-adamantan-1-ilcarboxamidobutil) tiocarbamoilo]-1,6-anhidro-L-idonójirimicina
NADH:	Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
NAO:	Nonil-Acridina Orange
nDNA:	DNA nuclear
O₂⁻:	Anión superóxido
OH⁻:	Radical hidroxilo
OXPPOS:	Sistema de Fosforilación Oxidativa
PBS:	Solución salina de fosfato
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PDI:	Proteína disulfuro isomerasa
PE:	Fosfatidiletanolamina
qRT-PCR:	PCR en tiempo real o cuantitativa
RE:	Retículo endoplasmático
RNA:	Ácido ribonucleico
RNasa:	Ribonucleasa
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR:	PCR con retrotranscriptasa
SDH:	Succinato deshidrogenasa
SDS:	Dodecil sulfato sódico
TMRM:	Éster metílico de tetrametilrodamina
tRNA:	Ácido ribonucleico transferente
UCP:	Proteína desacoplante
VDAC:	Canal aniónico dependiente de voltaje, porina mitocondrial.
$\Delta\Psi_m$:	Potencial de membrana mitocondrial

2.RESUMEN

2. RESUMEN

Las mitocondrias son orgánulos celulares que desempeñan funciones esenciales para la fisiología de la célula. Las funciones mitocondriales son cruciales para el desarrollo y supervivencia celular. La existencia de alteraciones de la función mitocondrial se ha asociado frecuentemente con la aparición de diversas patologías, entre las que destacan enfermedades neurodegenerativas, enfermedades raras y el cáncer. La disfunción mitocondrial puede originarse por mutaciones en el ADN mitocondrial (mtDNA) o nuclear (nDNA) o por otras causas que afectan secundariamente al metabolismo mitocondrial.

En la actualidad la disfunción mitocondrial es considerada como un común denominador que une diversos trastornos patológicos tanto en enfermedades mitocondriales como lisosomales. En las enfermedades mitocondriales, nos encontramos específicamente con una disfunción mitocondrial primaria, causada por las mutaciones genéticas, que inciden directamente sobre la composición y la función de la cadena de transporte de electrones. Estas mutaciones provocan defectos en el metabolismo oxidativo mitocondrial, que afecta gravemente a la fisiología celular. En las enfermedades lisosomales, la pérdida de función de las enzimas lisosomales, genera un metabolismo anormal de varios sustratos que no se degradan y se acumulan progresivamente en los lisosomas que afectan a su función y secundariamente a otros orgánulos como las mitocondrias.

Dado que el tratamiento de estas alteraciones no es completamente satisfactorio existe una necesidad de nuevas terapias para tratar la disfunción mitocondrial, tanto primaria como secundaria. Para ello puede ayudar el hecho de que existen patrones fisiopatológicos comunes a pesar de tener un origen diferente.

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de patologías con gran heterogeneidad, cuyo nexo de unión es una disfunción en la incapacidad de las mitocondrias afectadas de generar suficiente ATP mediante el sistema de fosforilación oxidativa y la producción aumentada de ROS. Con frecuencia estas enfermedades se acompaña de deficiencia de coenzima Q₁₀, único transportador de electrones que lleva equivalentes reductores desde el complejo I y el II al complejo

III y antioxidante lipídico sintetizado en los humanos. Las enfermedades mitocondriales son alteraciones graves generalmente resistentes a las terapias farmacológicas, a pesar del gran progreso en nuestro conocimiento de las bases moleculares que las producen.

El síndrome MERRF que debe su nombre al acrónimo en inglés de Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers (epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas) es una enfermedad mitocondrial primaria causada generalmente por mutaciones puntuales en los genes del ARN de transferencia (tRNA) codificados por el mtDNA. La mutación más común relacionada con este síndrome, que supone un 80% de los casos, es la transición de una adenina a una guanina en la posición 8344 en el gen *MT-TK* del genoma mitocondrial (m.8344A>G) que codifica para tRNA^{Lys}. La mutación afecta a la traducción de las proteínas codificadas por el mtDNA dificultando el ensamblaje correcto de los complejos respiratorios y provocando una disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial.

La primera parte de esta tesis ha consistido en evaluar la efectividad terapéutica de la coenzima Q₁₀ sobre la disfunción mitocondrial primaria y las alteraciones fisiopatológicas presentes en fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF y en cíbridos transmitocondriales portadores de la mutación 8344A>G, para comprobar en estos últimos que las alteraciones fisiopatológicas detectadas se debían a las mitocondrias disfuncionales independientemente del contexto nuclear y confirmar así los efectos beneficiosos de la coenzima Q₁₀.

Por su parte, las enfermedades lisosomales describen un heterogéneo grupo de enfermedades raras hereditarias con pérdida de función de los enzimas lisosomales que provocan la acumulación en los lisosomas del material no catabolizado, causando desequilibrio autofágico, acumulación de mitocondrias disfuncionales e inflamación. Clínicamente las enfermedades lisosomales cursan con fenotipos que incluyen visceromegalia, patologías neurológicas, lesiones esqueléticas y muerte prematura. En la actualidad algunas de estas patologías solo disponen de terapias sintomáticas que siguen dos estrategias terapéuticas principales: la terapia de reducción de sustrato (TRS), que se caracteriza por la inhibición de las enzimas implicadas en la producción del sustrato que se acumula, y la terapia de reemplazo

enzimático (TRE), que se caracteriza por la administración de forma exógena de la enzima recombinante activa que se encuentra defectuosa.

La enfermedad de Gaucher es la enfermedad lisosomal más predominante. Está causada por mutaciones en el gen *GBA1* que resultan en una enzima β -glucocerebrosidasa (GCase) defectuosa o de insuficiente actividad. Muchas de estas mutaciones conducen a defectos significativos en el plegamiento de la proteína durante la traducción en el retículo endoplasmático (RE), dando como resultado una reducción del transporte de la enzima al lisosoma donde realiza su función hidrolítica. La disminución de su actividad catalítica provoca la acumulación de glucosilceramida (GlcCer) y glucosil-esfingolípidos en los lisosomas de macrófagos y órganos viscerales. La enfermedad de Gaucher se subdivide en 3 tipos basados en la edad que comienza a manifestarse la enfermedad y la afectación del sistema nervioso central (SNC). Los pacientes con la enfermedad de Gaucher sin manifestaciones del SNC son clasificados como tipo I, más común; mientras que aquellos pacientes con manifestaciones neurológicas se clasifican en los tipos II y III. Para el trastorno lisosómico de la enfermedad de Gaucher, la TRE supone un alto coste económico y no es muy eficaz para los casos que muestran implicación del sistema nervioso central ya que las enzimas recombinantes no atraviesan la barrera hematoencefálica. De este modo, existe un gran número de pacientes para los cuales no existe tratamiento o la efectividad del mismo es muy baja. Una de las mutaciones más prevalentes en la enfermedad de Gaucher es la variante L444P, que resulta en un incorrecto plegamiento de la GCase en el RE y fallos en su transporte al lisosoma. Los pacientes en homocigosis para la mutación L444P presentan formas neurológicas severas de la enfermedad. La mutación es un cambio de base 1448T>C en el gen *GBA1* que da lugar a la sustitución del aminoácido lisina por prolina en la posición 444 en la cadena polipeptídica, localizada en uno de los dominios no catalíticos de la enzima GCase. Esta mutación es especialmente refractaria a los tratamientos disponibles, incluida la TRE, por lo que existe la necesidad urgente de desarrollar estrategias terapéuticas que sean útiles en los enfermos con este genotipo. Algunos inhibidores de las enzimas glicosidasas implicadas en enfermedades lisosomales son capaces de unirse al sitio activo y

estabilizar el plegamiento apropiado, pudiendo actuar como “chaperonas farmacológicas” que facilitan el transporte de la forma catalíticamente activa a los lisosomas. De este modo, el desarrollo o la búsqueda de compuestos con actividad de chaperona farmacológica se ha postulado como una posible estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades lisosomales, de particular interés para aquellas manifestaciones clínicas de la enfermedad que involucran al sistema nervioso central. Recientemente, se ha descrito que los iminoazúcares sp2 bicíclicos derivados de L-idonojirimicina se comportan como chaperonas farmacológicas en fibroblastos humanos de Gaucher homocigotos para la mutación L444P, aumentando la actividad glucocerebrosidasa y el tráfico de la enzima a los lisosomas. Uno de los candidatos más prometedores dentro de esta familia de chaperonas farmacológicas es la N-[N'-(4-adamantan-1-ilcarboxamidobutil) tiocarbamoilo]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina (NAdBT-AIJ). Algunas de las ventajas que presenta esta terapia son un menor coste de producción, la posibilidad de su administración oral y su capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica.

A pesar de su potencial, la investigación en terapia con chaperonas farmacológicas no ha conducido aún al desarrollo de nuevos fármacos en la práctica clínica. Este objetivo último se facilitaría enormemente con el desarrollo de estrategias que potenciasen la acción de las chaperonas farmacológicas, por ejemplo mediante la combinación con otros compuestos activos. Existe por tanto la necesidad de identificar moléculas que permitan corregir o mejorar las patologías asociadas a las enfermedades lisosomales, en particular a la enfermedad de Gaucher, y que actúen en sinergia con las chaperonas farmacológicas y produzcan un beneficio terapéutico superior. En la segunda parte de este trabajo se describe como el tratamiento combinado de la chaperona farmacológica NAdBT-AIJ para recuperar la actividad de la enzima GCasa y la coenzima Q₁₀ para actuar sobre la disfunción mitocondrial secundaria permite un beneficio terapéutico sinérgico y superior a los tratamientos individuales. Para ello, los tratamientos fueron realizados en fibroblastos dérmicos derivados de varios pacientes con la enfermedad de Gaucher portadores de la mutación L444P en homocigosis.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. *El objetivo general ha consistido en evaluar la efectividad terapéutica de la coenzima Q_{10} sobre la disfunción mitocondrial primaria o secundaria y caracterizar que mecanismos comunes se activan a nivel de la alteración celular.*

Para llevar a cabo este objetivo general, lo hemos dividido en 2 objetivos principales:

3.1.1. Primer objetivo principal.

El primer objetivo principal será evaluar la efectividad terapéutica de la coenzima Q_{10} sobre la disfunción mitocondrial y estudiar los mecanismos que se activan para la eliminación de las mitocondrias dañadas en fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF y en híbridos transmitocondriales portadores de la mutación 8344A>G.

3.1.2. Segundo objetivo principal.

El segundo objetivo principal será confirmar si la función mitocondrial en fibroblastos derivados de paciente con la enfermedad de Gauche, portadores de la mutación L444P en homocigosis, se encuentra alterada y evaluar la efectividad terapéutica del tratamiento combinado de la coenzima Q_{10} y la chaperona N- [N'-(4-adamantan-1-ilcarboxamidobutil)tiocarbamoilo]- 1,6-anhidro- L-idonojirimicina (NAdBT –AIJ).

4. INTRODUCCIÓN

4. INTRODUCCIÓN

La mitocondria es un orgánulo esencial para la producción de ATP de las células eucariotas mediante el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), a través de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM). Las mitocondrias son necesarias para la regulación de importantes funciones y procesos metabólicos celulares, que incluyen la apoptosis, la homeostasis de calcio y la respuesta contra el estrés oxidativo causado principalmente por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales [1]. Las proteínas mitocondriales se encuentran codificadas tanto por el ADN mitocondrial (mtDNA) como por el ADN nuclear (nDNA).

La mitocondria es capaz de cambios dinámicos de forma y tamaño. Pudiendo encontrarse como entidades discretas o formando parte una compleja red ramificada en la que las mitocondrias se encuentran interconectadas y esto les confiere la capacidad de moverse, fusionarse y fisiónarse [2].

La estructura de la mitocondria es crucial para su funcionamiento. La mitocondria se compone de dos membranas: la externa y la interna, con una composición de lípidos y proteínas, y características morfológicas y funcionales muy diferentes. La membrana interna define, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (Figura 1).

La membrana externa que separa a la mitocondria del citoplasma, es una bicapa lipídica que en condiciones fisiológicas es permeable al paso de iones y de metabolitos con pesos moleculares inferiores a 6.000 Da. La membrana externa contiene, entre otras proteínas, la porina o canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) [3] que permite la entrada y salida de proteínas y solutos [4]. Recientemente se han demostrado en la membrana externa zonas de interacción con el retículo endoplasmático, conocidas con el nombre de membranas asociadas a mitocondria (MAM) [5].

La membrana interna se caracteriza morfológicamente por presentar unos pliegues o invaginaciones denominadas ‘crestas’ que contiene cerca de un 70% de proteínas entre las cuales se encuentran las que forman parte de los complejos que forman la cadena de transporte de electrones (CTE) y la ATP sintasa que cataliza la formación del ATP, proceso conocido como Fosforilación Oxidativa.

Los electrones generados por la oxidación de grasas, carbohidratos y proteínas son transferidos al oxígeno, a través de la reducción secuencial de los componentes de la CTE, formando moléculas de agua. Este proceso es acoplado al bombeo de protones a través de la membrana interna desde la matriz al espacio intermembrana, generando un gradiente electroquímico que es usado por la ATP sintasa para sintetizar ATP (Figura 1).

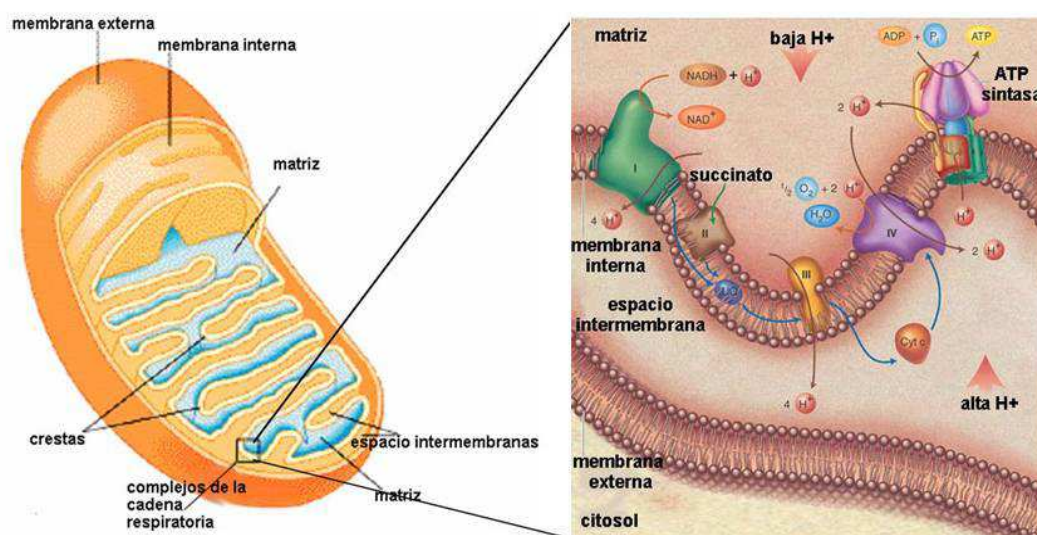


Figura 1. Estructura de la mitocondria y localización del sistema OXPHOS. “Modificado de <http://scienceknowledge.tumblr.com/post> y <http://www.uv.es/~mcostell/>”

El sistema OXPHOS, tiene lugar mediante una serie de complejos multiproteicos (numerados del I al IV) en la membrana interna mitocondrial, unidos por dos transportadores de electrones, la coenzima Q_{10} (CoQ) y el citocromo c, que junto a la ATP sintasa, constituye la fuente más importante de ATP en los organismos aeróbicos.

El transporte de electrones entre los Complejos I, II y III es realizado por la CoQ o ubiquinona, una molécula que presenta 3 estados REDOX, pequeña e hidrofóbica que puede difundir libremente por la membrana interna mitocondrial.

Este proceso de obtención de energía está coordinado a partir de dos mecanismos: el flujo de electrones, que ocurre en la CRM y el gradiente de protones a través de la ATP sintasa. El flujo de los electrones a través de los diferentes complejos proteicos de la CRM se utiliza para crear un gradiente de protones entre el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial, en el que los protones se bombean a dicho espacio a través de los complejos I, III y IV. El retorno a la matriz de los protones a favor de gradiente a través de la ATP sintasa, produce cambios en la configuración espacial de ésta, lo que posibilita la fosforilación del ADP y producción de ATP [6].

Los sustratos para estos procesos, en especial el poder reductor en forma de NADH y FADH₂, se obtienen de los procesos degradativos que tienen lugar en la matriz mitocondrial, tales como el ciclo de Krebs y la beta oxidación de ácidos grasos [7].

Las reacciones que tienen lugar a nivel de la NADH deshidrogenasa o complejo I capta 2 electrones del NADH y los transfiere a una molécula de CoQ, reduciéndola (CoQH₂). En el complejo I ocurren una serie de reacciones redox, en las que intervienen una coenzima FMN (flavina mononucleótido), y un centro Fe-S en el que el átomo de hierro es el que realiza el intercambio electrónico para cederlos al CoQ. El flujo de dos electrones desde el NADH hasta la ubiquinona, da lugar al bombeo de cuatro H⁺ a través de la membrana interna, desde la matriz hacia el espacio intermembrana [6].

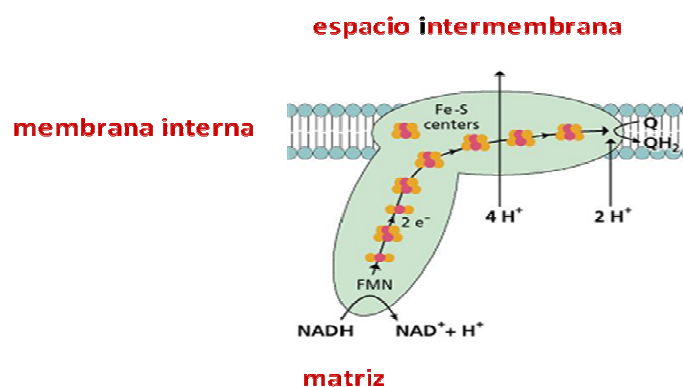


Figura 2. **Complejo I o NADH deshidrogenasa.**

El complejo II o Succinato-ubiquinona oxidoreductasa se encuentra a nivel de la membrana, y uno de sus componentes participa igualmente en el ciclo de krebs, la succinato deshidrogenasa, que cataliza la reacción de succinato a fumarato. Uno de los productos de la reacción, la coenzima reducido FADH_2 no abandona el complejo, transfiriendo los electrones en el interior del mismo a un centro Fe-S, para posteriormente ser cedidos a la coenzima Q. Esta es la única enzima del ciclo de krebs que no se encuentra libre en la matriz mitocondrial, sino que está fuertemente unida a la membrana interna mitocondrial. Por otro lado, algunas de las enzimas mitocondriales que utilizan FAD (acil-CoA deshidrogenasa, primera enzima de la β -oxidación), no introducen sus electrones a la cadena de transporte electrónico a través del complejo II, sino mediante una flavoproteína transportadora de electrones (ETF-Q oxido reductasa) que reduce directamente la ubiquinona o coenzima Q. El potencial de transferencia electrónica es menor en este complejo que en el anterior, y el desprendimiento energético no es suficiente para el bombeo de protones[3].

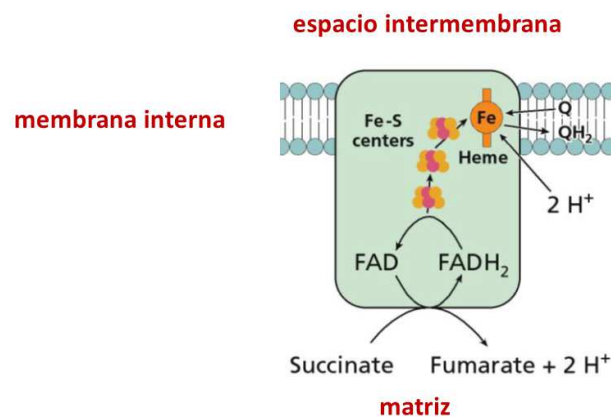


Figura 3. El complejo II o Succinato-ubiquinona oxidoreductasa

La segunda bomba de protones, se sitúa en el complejo III o Ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa, transfiere electrones desde el coenzima Q reducido o ubiquinol (CoQH_2), procedente de los complejos I y II, para reducir moléculas hidrosolubles de citocromo c en un proceso conocido como *Ciclo del Q*. El complejo III se caracteriza principalmente por disponer de grupos prostéticos hemo, similares a los de la hemoglobina, con un átomo de Fe que se alterna entre su estado reducido o ferroso (Fe^{2+}) y el estado oxidado o férrico (Fe^{3+}). A través de la siguiente secuencia de reacciones los electrones son transferidos hasta el citocromo c, este flujo genera un potencial suficiente para bombear 2 H^+ hacia el espacio intermembrana (Figura 4).

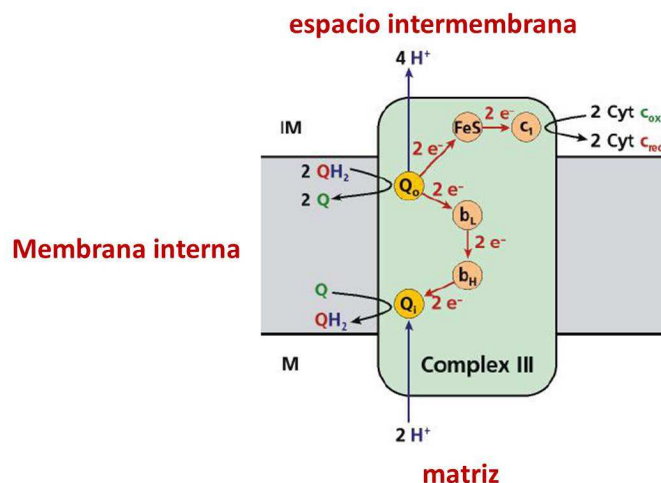


Figura 4. **Complejo III o Ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa**

El ciclo del Q permite la transferencia de electrones de CoQ al citocromo c y el transporte de protones al espacio intermembrana. La ubiquinona en el ciclo Q (Figura 5), es reducida por la deshidrogenasa en el lado de la matriz mitocondrial formando ubiquinol o CoQH_2 que al no tener carga es translocado o migra por lo ancho de la membrana hidrofóbica hacia el espacio intermembrana, para donar aquí un electrón hacia uno de los centros Fe-S más el Citocromo c_1 y liberar uno de sus dos protones. La quinona al quedar como semiquinona o CoQH^- con carga negativa, se convierte en una molécula fuertemente reductora y entrega el otro

electrón al otro centro Fe-S representado por los Citocromos bL y bH. La semiquinona queda entonces como Quinona CoQH, sin carga y nuevamente vuelve al lado de la matriz mitocondrial para recibir el electrón transportado por medio de ambos Citocromos b formando nuevamente en este lado semiquinona. Esta recibirá nuevamente otros dos protones desde la matriz para ser llevados hacia el espacio intermembrana. El grupo hemo del citocromo b retiene la carga, mientras que la Ubiquinona reducida atraviesa la membrana. Así, por cada dos moléculas de ubiquinol oxidadas, se liberan 4 protones al espacio intermembrana y se reducen dos moléculas de citocromo c y una de ubiquinona, que capta los protones de la matriz contribuyendo a la creación del gradiente electroquímico a lo largo de la membrana mitocondrial [8].

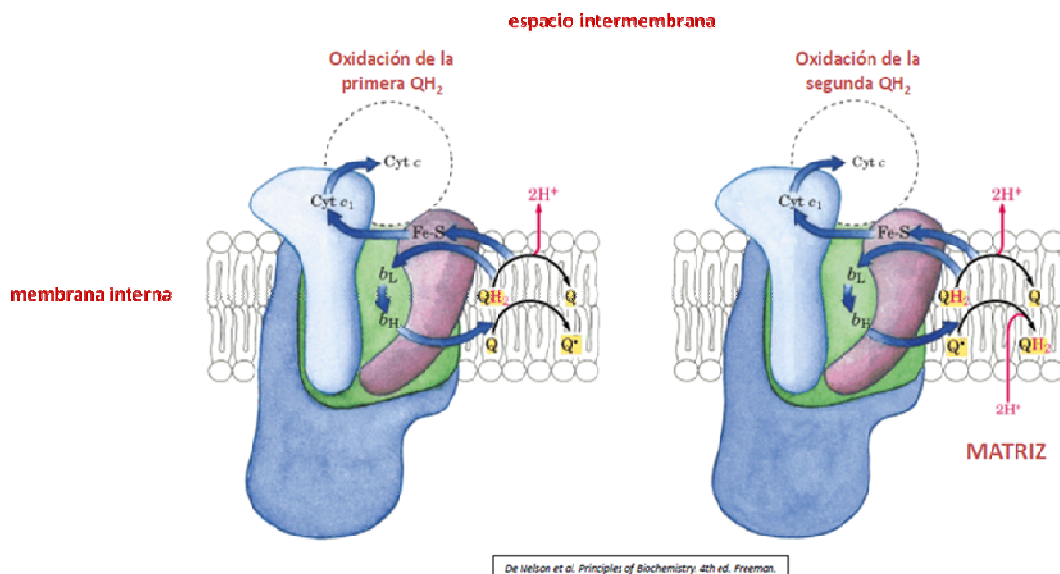


Figura 5. Complejo III-Ciclo del Q. "De Nelson et al. Principles of Biochemistry. 4th ed. Freeman."

A través del complejo IV, la citocromo-oxidasa acepta cuatro electrones del citocromo c, uno cada vez, a través de dos grupos hemo que utilizan átomos de cobre y los transfiere a una sola molécula de O_2 formando dos moléculas de H_2O . El oxígeno molecular es un aceptor de electrones con un fuerte carácter oxidante, una alta tendencia a captar electrones, pero reacciona muy lentamente a menos que sea activado catalíticamente. Esta activación es realizada por este complejo, el cual también funciona como una bomba de protones, realizando un movimiento neto de 4 H^+ hacia el espacio intermembrana (Figura 6).

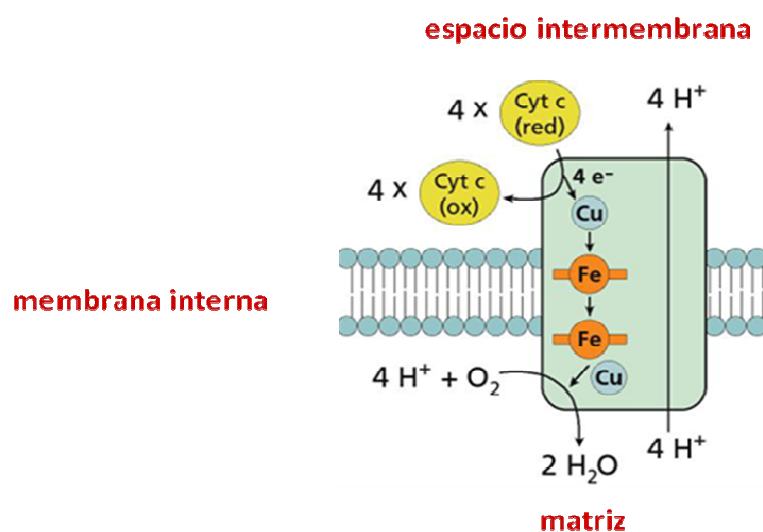


Figura 6. **Complejo IV o citocromo-oxidasa.**

El bombeo de protones a través de la membrana interna, crea una diferencia de ΔpH entre ambos lados de la membrana, o en voltaje $\Delta \Psi_m$; El resultado de ambos cocientes es la fuerza protón-motriz Δp , que mide el rendimiento químico del gradiente de H^+ . Este gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna ($\Delta \Psi_m$: potencial de membrana mitocondrial), nos indica del estado funcional de la mitocondria. El reflujo de H^+ generado del espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial, es utilizado por la ATP sintasa para producir ATP a partir ADP y fosfato inorgánico. El ATP obtenido ingresa al espacio intermembrana al tiempo que este expulsa ADP por medio de la Translocasa de

Nucleótidos de Adenina (Figura 7). Una vez allí, el ATP es transferido al citoplasma a través de las proteínas Porinas de la membrana externa mitocondrial [3].

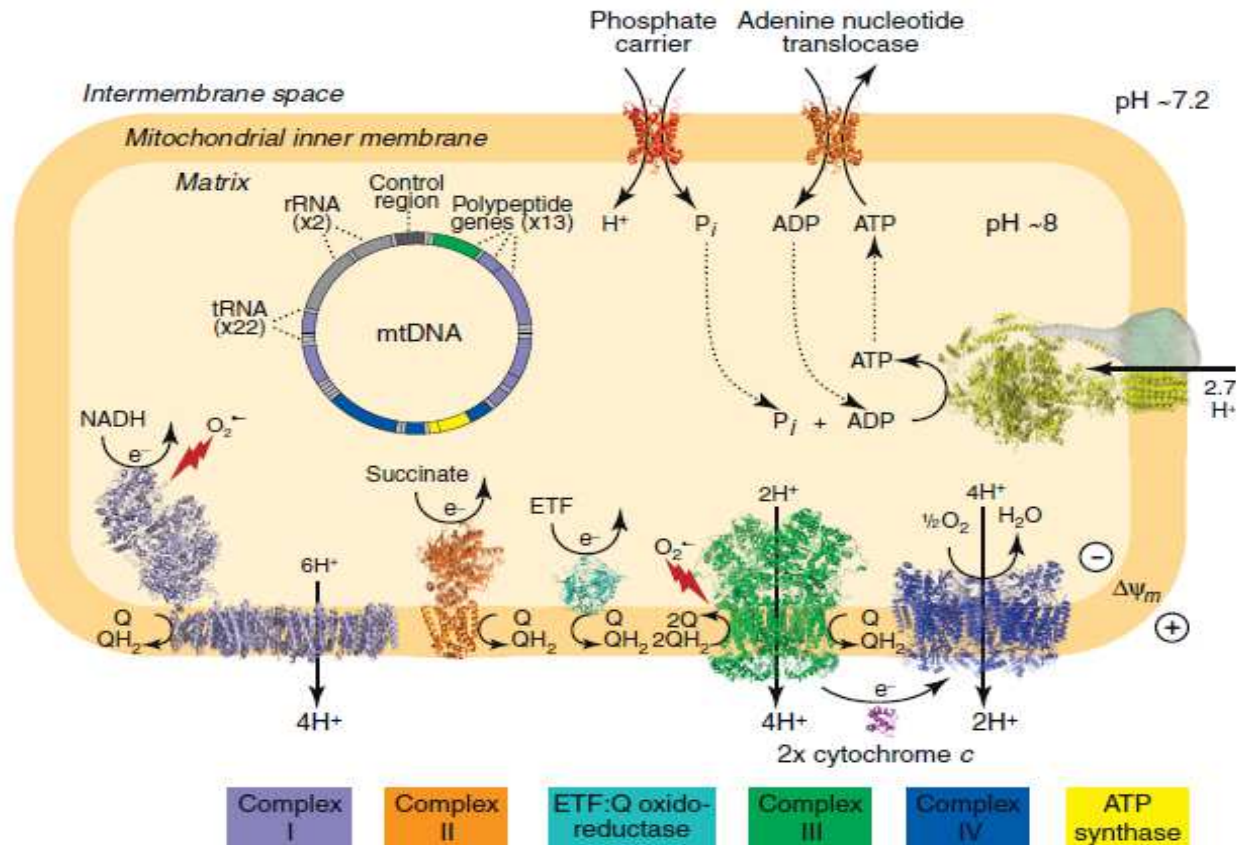


Figura 7. **Sistema OXPHOS y localización del DNA mitocondrial.** “Mitochondrial pharmacology. Trends in Pharmacological Sciences 2012”

El $\Delta\Psi_m$ también es utilizado como fuente de energía para el importe de proteínas y otras moléculas, además de producir calor para mantener la temperatura corporal, en el caso de que los protones reingresen a la matriz mitocondrial a través de las proteínas desacoplates (UCP). La membrana interna resulta especialmente impermeable a iones gracias a su alto contenido en el fosfolípido cardiolipina, característica esencial que le permite soportar el gradiente electroquímico necesario para el desempeño de la función energética.

A pesar de la existencia de estos compartimentos, que a primera vista parecen estancos, la estructura mitocondrial permite el paso regulado de proteínas mediante procesos controlados por unos complejos proteicos transmembranales en la membrana interna (TIM) y en la externa (TOM), que son capaces de discriminar entre aquellas proteínas que deben dirigirse a la matriz y las que lo harán hasta el espacio intermembrana [9]. Para regular esta permeabilidad, existen zonas de contacto entre las membranas mitocondriales, cuyos componentes proteicos son capaces de interaccionar bajo ciertas condiciones patológicas, cambiando radicalmente la permeabilidad y dar lugar a la formación de un canal, el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP), del que también forman parte proteínas del citoplasma y de la matriz mitocondrial [10]. Cuya apertura permite la salida masiva de proteínas pudiendo provocar la muerte celular.

En la matriz tienen lugar importantes procesos metabólicos, principalmente el Ciclo de Krebs y la beta-oxidación de los ácidos grasos [11]. Localizado en la matriz mitocondrial se encuentra su propio genoma, compuesto por una hélice doble circular de 16.569 pares de bases, los 37 genes del ADN mitocondrial son necesarios para ensamblar la maquinaria de la fosforilación oxidativa en su membrana interna [7]. De estos genes, 13 codifican subunidades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial: siete subunidades del complejo I, una subunidad del complejo III, tres subunidades del complejo IV y dos subunidades del complejo V. Además, se requieren 22 ARN transferentes (tRNA) y 2 ARN ribosomales (rRNA) para la síntesis proteica mitocondrial. El ensamblaje mitocondrial es un proceso complejo y altamente regulado. Este sistema tiene un origen dual, dependiendo de la expresión coordinada de los genomas mitocondrial y nuclear. La mayoría de las otras proteínas mitocondriales son codificadas por genes nucleares traducidos en el citoplasma y luego importadas hacia la mitocondria [12]. El nDNA codifica un amplio número de genes que se requieren para la fosforilación oxidativa, incluyendo 72 subunidades polipeptídicas, así como todos los factores necesarios para el ensamblaje correcto de la cadena respiratoria y la maquinaria necesaria para la integridad, replicación, reparación y expresión del mtDNA.

Además de producir ATP en los organismos aeróbicos, las mitocondrias son esenciales para la homeostasis NAD^+/NADH , el calcio, la regulación de la temperatura en tejidos y órganos y la apoptosis. Las funciones mitocondriales son cruciales para el desarrollo y la supervivencia celular [13].

Disfunción mitocondrial

Las mutaciones en los genes del mtDNA o del nDNA que codifican para una proteína mitocondrial provocan directamente defectos en el metabolismo oxidativo mitocondrial. Así mismo, las mutaciones en los genes implicados en la fusión/fisión de mitocondrias también causan alteraciones mitocondriales al incidir directamente en el control de calidad mitocondrial [14, 15]. Las mutaciones en otros genes que afectan a la función de otros orgánulos o a procesos metabólicos fuera de la mitocondria también pueden causar afectaciones de las mitocondriales de forma secundaria [16-18].

La disfunción mitocondrial se caracteriza por una alteración de la CTE que perjudica el flujo normal de electrones y el bombeo de protones en el sistema OXPHOS, induciendo una disminución del $\Delta\Psi_m$, la reducción en la síntesis de ATP y un aumento del estrés oxidativo por el aumento en la producción de ROS en la mitocondria. Ante esta situación, la célula activa diferentes mecanismos de control mitocondrial para mantener una correcta funcionalidad mitocondrial y la homeostasis celular.

Para mantener la homeostasis intracelular la célula activa 2 vías principales de degradación, la necesaria para vía ubiquitina proteosoma encargada de degradar proteínas alteradas o innecesarias y la vía autofágica lisosomal o autofagia.

El término “autofagia” fue acuñado por el descubridor de los lisosomas como entidades diferenciadas, en 1955 por Christian de Duve [19]. La autofagia es un importante proceso constitutivo encargado de la degradación de componentes celulares y de orgánulos inservibles o defectuosos por la maquinaria lisosomal permitiendo de este modo el reciclaje del material intracelular [20].

El proceso autofágico se activa en las células principalmente en ausencia de nutrientes, ya que es consiguiente catabolismo celular genera aminoácidos y otros productos metabólicos intermediarios para mantener la producción de ATP. El proceso autofágico constituye una vía de adaptación a situaciones de estrés que generalmente promueve la supervivencia celular, por lo que tiene un papel protector sobre la célula, previniendo la muerte por apoptosis. La autofagia se ha dividido en tres tipos diferentes según el mecanismo por el cual el lisosoma degrada el material intracelular, en los que se incluyen la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas [21](Figura 8). La macroautofagia consiste en el secuestro de regiones citoplasmáticas incluyendo orgánulos mediante una vesícula membranosa (fagóforo o pre-autofagosoma), formándose un compartimento de doble membrana, el autofagosoma, que posteriormente se fusiona con el lisosoma para formar el autofagolisosoma, donde es degradado mediante digestión hidrolítica [22]. En la microautofagia también se lleva a cabo la degradación de proteínas y organulos, pero a diferencia de la “macroautofagia” es el lisosoma quien capta directamente los diferentes componentes citosólicos a degradar, mediante una invaginación de la membrana lisosomal [23]. En la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas a degradar son incorporadas directamente a los lisosomas de manera específica y mediante un complejo de translocación. Existen variadas proteínas con motivos KFERQ, secuencias peptídicas (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln), que marcan proteínas citosólicas para la proteólisis lisosomal. La exposición de esta secuencia facilita la formación de un complejo con la proteína chaperona Hsc70, lo cual permite dirigir el complejo hacia el lisosoma donde la proteína de la membrana lisosomal Lamp2A sirve como un adaptador y permitiendo el ingreso de la proteína a degradar en el interior del lisosoma [24].

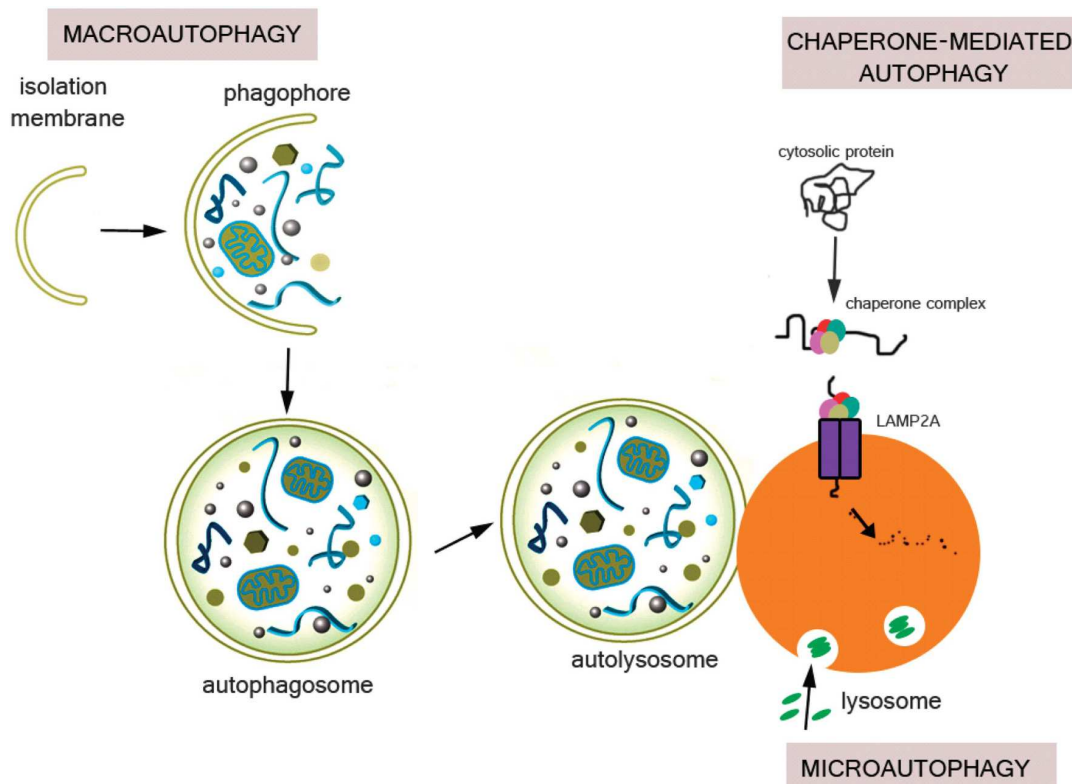


Figura 8. **Mecanismos de autofagia.**“ V Nikolettou - 2015 Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system”

Aunque la autofagia se conoce desde hace varias décadas, no empezó a caracterizarse molecularmente hasta el descubrimiento de las proteínas Atg (*autophagy-related gene*) en levaduras [25] y revisado por Klionsky [26]. Se han identificado unos 30 genes ATG (Autophagy related Genes), involucrados de forma directa en el proceso autofágico y diferentes vías que regulan este proceso (Figura). Entre estas tenemos la vía mTOR (Mammalian target of rapamycin) que pertenece a la familia de las quinasas y controla el crecimiento, proliferación y supervivencia celular y la vía AMPK que en condiciones de estrés se activa e inicia una doble cascada activando la autofagia mediante la inhibición de mTOR.

Una de las proteínas implicadas en el proceso autofágico es LC3 (del inglés, Microtubule-associated protein-light chain 3), es una proteína citoplasmática soluble que sufre modificaciones que la lleva a conjugarse con una molécula de fosfatidiletanolamina (PE) para terminar uniéndose a la membrana del autofagosoma. LC3-PE (LC3-II) está presente tanto en las etapas iniciales de elongación de la membrana de aislamiento como en el autofagosoma ya maduro,

lo que la convierte en un excelente marcador para el estudio de la dinámica de la membrana durante la autofagia (Figura 9).

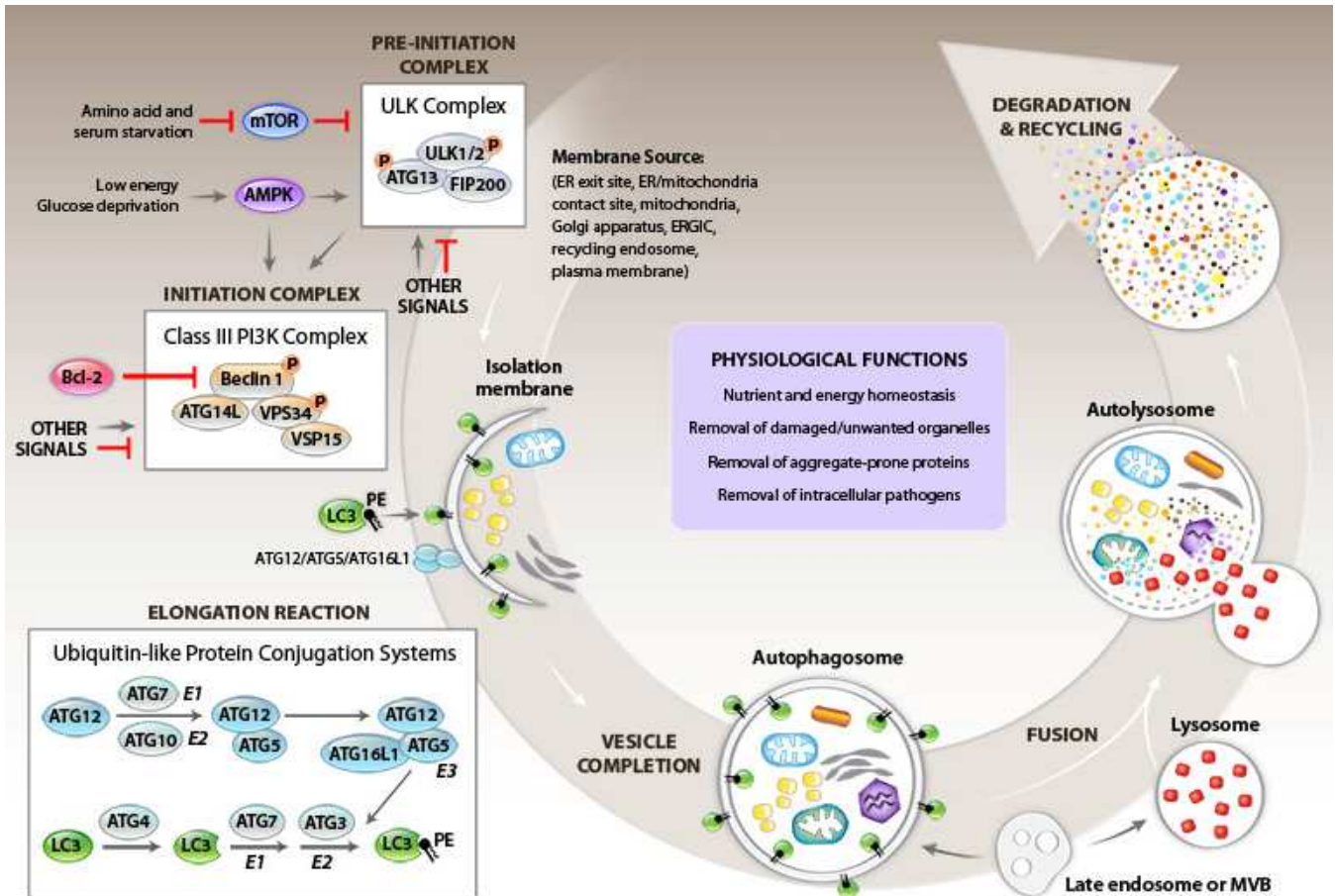


Figura 9. **Autofagia.**” <http://www4.utsouthwestern.edu/idlabs/Levine2011/levineIndex.html>”

Existe un gran número de estudios que confirman el papel protector de la autofagia en múltiples tipos celulares [27-29] y situaciones [30]. Sin embargo, se ha propuesto que la macroautofagia puede actuar igualmente como un tipo de muerte celular distinto de la apoptosis [21] ya que la degradación autofágica es un proceso esencialmente catabólico que potencialmente podría ser usado por la célula para autodestruirse. Por tanto, la regulación de la autofagia en la célula parece ser esencial para el balance entre la supervivencia y la muerte celular [31].

La autofagia ha sido definido como un proceso general no selectivo en la célula, aunque en los últimos años existen claras pruebas experimentales que demuestran que la autofagia puede ser un proceso selectivo [32, 33].

El término mitofagia fue acuñado por Lemasters en el año 2005 para referirse a la degradación selectiva de mitocondrias por autofagia [33]. En concreto, la mitofagia permite la regulación del número de mitocondrias funcionales en la célula, tanto para satisfacer la demanda metabólica como para llevar a cabo un control de calidad que permita eliminar las mitocondrias disfuncionales que puedan provocar daño en la célula [17](Figura 10).

Al igual que el proceso autofágico, parece ser que la mitofagia ejerce un papel protector sobre las células en numerosas situaciones. El proceso mitofágico degrada selectivamente las mitocondrias dañadas con bajo potencial de membrana y altos niveles de ROS, que si permanecieran en la célula provocarían la activación de las caspasas y el inicio de la apoptosis. Las mitocondrias, durante el proceso de respiración acoplado a la cadena de transporte de electrones, produce ROS, como el anión superóxido mitocondrial (O_2^-) [34] o peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estos radicales se producen en más cantidad si la mitocondria se encuentra alterada [35]. Debido a esto, las mitocondrias están altamente expuestas al estrés oxidativo, que provoca la apertura de los poros de transición de la permeabilidad en la membrana interna de la mitocondria [36], por lo que se induce el proceso de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) [37]. La MPT incrementa la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial a iones y metabolitos y ocasiona el colapso del potencial mitocondrial asociado a un aumento de ROS. A su vez, la pérdida de potencial de membrana mitocondrial o la perturbación de la integridad mitocondrial [38] asociado a un aumento de los ROS y del daño oxidativo [39] puede activar la mitofagia [40]. El daño provocado en las membranas celulares, inducido por las ROS ocasiona la degradación oxidativa de los lípidos de membrana o peroxidación lipídica que se ha relacionado con la activación mitofágica [41]. Además, los ROS son genotóxicos, y provocan la acumulación de mutaciones en el mtDNA. Por tanto, las mitocondrias acumulan daño oxidativo a lo largo del tiempo, lo que puede agravar la disfunción mitocondrial e incluso provocar la apoptosis de la célula debido a la liberación desde la mitocondria de proteínas proapoptóticas.

Tanto en levaduras [42] como en mamíferos se ha observado que el proceso mitofágico viene precedido por una fisión mitocondrial, que permite transformar las mitocondrias elongadas que forman parte de la red en mitocondrias pequeñas capaces de ser engullidas por el autofagosoma.

En mamíferos se conocen varios mecanismos mitofágicos diferentes [32]. En la mayoría de los mamíferos, los glóbulos rojos pierden las mitocondrias durante su maduración, mediante mitofagia. La proteína NIX (de inglés NIP3-like protein X), presente en la membrana mitocondrial externa, posee un dominio *WXXL-like* en la cara citosólica, que es capaz de unirse a la proteína LC3 marcador de membrana del autofagosoma, promoviendo el aislamiento de la mitocondria en el fagóforo [43].

En segundo lugar se ha demostrado que la quelación del hierro intracelular produce una fuerte respuesta mitofágica por un mecanismo que aun no ha sido caracterizado [44].

Finalmente el mecanismo mitofágico mas importante presente en mamíferos parece estar inducido por la despolarización de la membrana mitocondrial, debida a la acumulación de daños y agentes nocivos en la mitocondria, tales como los ROS [39]. Este proceso es dependiente de la interacción entre la quinasa PINK1 y la ubiquitin ligasa Parkina. En el año 2008 se describió que la Parkina se transloca a las mitocondrias despolarizadas para promover su degradación mediante mitofagia [45]. Parkina es una E3 ubiquitin ligasa citosólica, con un dominio *ubiquitin-like* en su extremo N-terminal, que le permite mediar la transferencia de ubiquitinas a residuos de lisina tanto a ella misma como a otras proteínas [46]. La acción de la Parkina abarca desde mono-ubiquitinación de proteínas, que puede ejercer varias funciones celulares, hasta la poliubiquitinación de proteínas que da lugar a una señalización para su degradación por el proteosoma. PINK1 es una serin treonin quinasa cuya localización celular aún no está clara, ya que se encuentra tanto en el citosol como en algunos compartimentos mitocondriales.

En condiciones normales, tanto PINK1 como Parkina actúan regulando la morfología mitocondrial interaccionando con la maquinaria de fusión/fisión mitocondrial. En situaciones fisiológicas, PINK1 sufre un procesamiento proteolítico

y es degradada en las mitocondrias sanas por proteasas como PARL (del inglés, Presenilins-associated rhomboid-like) en el espacio intermembrana [47]. Sin embargo, en condiciones de disipación del $\Delta\Psi_m$, debido a daños mitocondriales (por ROS), pérdida de respiración mitocondrial, mutaciones en el mtDNA, uso de desacoplantes, etc., PINK1 es acumulada en la membrana mitocondrial externa [48]. La estabilización de PINK1 en la membrana externa provoca mediante una fosforilación directa la traslocación de Parkina a la mitocondria y el aumento de su actividad ubiquitin ligasa [49]. Tras su activación la Parkina ubiquitina a diferentes proteínas como VDAC1, Mitofusinas (Mfn) 1 y 2 (proteínas implicadas en la fusión mitocondrial), entre otras [50]. A continuación, la ubiquitinación de proteínas mitocondriales promueve el reclutamiento de proteínas adaptadoras, como p62/SQSTM1 y NBR1 [51, 52]. Estas proteínas son capaces de unirse a las proteínas ubiquitinadas de la membrana externa de la mitocondria y también a proteínas autofágicas como LC3, por lo que pone en contacto la mitocondria despolarizada con el fagóforo [45, 51]. Además de la ubiquitinación de Mfn 1 y de Mfn2 aumentaría la fisión y la fragmentación mitocondrial [53]. Así, la fragmentación y la fisión mitocondrial son necesarias para el comienzo de la mitofagia. A su vez la despolarización mitocondrial impide la fusión mitocondrial y aumentaría el número de mitocondrias aisladas y promovería la mitofagia [54]. Por el contrario el aumento de la fusión mitocondrial se ha demostrado que inhibe el proceso de mitofagia [55].

Existen numerosos estudios sobre la importancia de Parkina y PINK1 en el control de calidad mitocondrial y en la viabilidad celular [56]. Los estudios en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas a neuronas dopaminérgicas a las que se les noqueó el gen de la Parkina han demostrado una reducción de la viabilidad celular. Sin embargo el silenciamiento de Parkina en otras líneas celulares (células Hela), no tuvo ningún efecto en su viabilidad celular. Lo que sugiere que el silenciamiento de Parkina si ejerce un efecto en la viabilidad celular de neuronas dopaminérgicas y que la falta de Parkina no es necesaria para la supervivencia celular en otros modelos celulares.

El control de calidad mitocondrial, incluye la activación de varios sistemas antioxidantes para eliminar el exceso de ROS. En primer lugar el O_2^- se convierte en H_2O_2 mediante la enzima superóxido dismutasa MnSOD. A su vez, el H_2O_2 es eliminado por una peroxirredoxina mitocondrial y la glutatión peroxidasa [57].

Además la mitocondria cuenta con proteínas chaperonas como mtHsp70 y Hsp60 que ayudan a estabilizar el plegamiento de las proteínas, evitando así la agregación de proteínas mitocondriales y su degradación por las proteasas y el sistema ubiquitina proteosoma (UPS) [58]. El sistema proteolítico mitocondrial consta de proteasas específicas que junto al sistema ubiquitina proteosoma regula la cantidad de proteínas mitocondriales [59]. Dado que las mitocondrias están altamente expuestas a estrés oxidativo y pueden dañarse se produce un recambio constante mitocondrial en las células, que permite la degradación de las mitocondrias envejecidas o alteradas. De no ser así, la acumulación de las mitocondrias comprometería la viabilidad celular [38, 60].

A su vez, la mitofagia debe estar acompañada de un mecanismo compensatorio que aumente la biogénesis mitocondrial para evitar la pérdida excesiva de mitocondrias [40, 61, 62]. La activación de la mitofagia en las células con alteraciones mitocondriales puede funcionar como un mecanismo de protección mediante el cual se eliminan las mitocondrias disfuncionales (con altos niveles de ROS, bajo potencial de membrana y disrupción de la cadena de transporte de electrones mitocondrial a un ritmo superior que en las células sanas).

La degradación selectiva de mitocondrias disfuncionales por mitofagia (Figura) puede activarse en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson [63], enfermedades mitocondriales [64, 65] o en trastornos lisosomales [66].

Ambos procesos, la mitofagia y la biogénesis mitocondrial, deben ser tenidos en cuenta como posibles dianas terapéuticas para mantener una población saludable de mitocondrias [67].

La dinámica mitocondrial, en un aspecto importante en la fisiología celular [54]. La maquinaria de fusión y fisión [18] mitocondrial desempeña un papel fundamental

en la regulación de mitofagia [55] y poder mantener así un eficiente control de calidad mitocondrial [68, 69].

La dinámica mitocondrial mantiene su equilibrio por un lado por la acción de las GTPasas de la membrana mitocondrial externa: las proteínas Mfn-1 y Mfn-2 que promueven la fusión mitocondrial y la GTPasa de la atrofia óptica (Opa1) de la membrana mitocondrial interna, que regulan la red mitocondrial mediante la fusión de las mitocondrias adyacentes y las proteínas. Por otro lado, la proteína de la membrana externa mitocondrial (FIS1) y la proteína citosólica relacionada con las dineínas (DRP1) están implicadas en la fisión mitocondrial [69, 70]. Estos procesos opuestos determinan la organización y el funcionamiento de toda la red mitocondrial de la célula [55].

La manipulación de la dinámica mitocondrial sería un tratamiento potencialmente interesante para el tratamiento de la disfunción mitocondrial, ya que desplazaría el equilibrio de la fisión y de la fusión, permitiendo que las mitocondrias dañadas sean rescatadas por fusión mitocondrial o bien que sean eliminadas selectivamente por mitofagia. La morfología de la red mitocondrial está relacionada con la aparición de distintas alteraciones. Por tanto, la recuperación de la red mitocondrial se asocia con una mejora en la fisiopatología mitocondrial. Cuando las mitocondrias se vuelven disfuncionales, la red mitocondrial se fragmenta y las mitocondrias aisladas aparecen redondeadas, pequeñas y depolarizadas [54].

Por lo tanto, la fisión mitocondrial desempeña un importante papel en la eliminación de las mitocondrias dañadas por mitofagia [71].

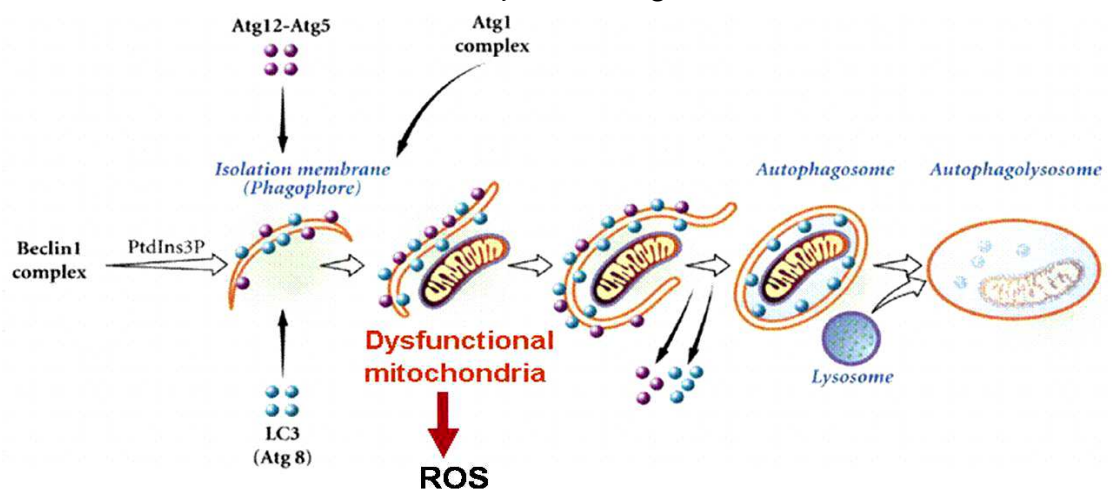


Figura 10 . **Mitofagia.**

Tratamiento de la disfunción mitocondrial; Coenzima Q₁₀

En la actualidad los tratamientos de la disfunción mitocondrial están diseñados para contrarrestar las consecuencias celulares de la disfunción de la CRM [72]. Ante la imposibilidad de administrar energía en forma de ATP, se han propuesto tratamientos para que aumenten su síntesis. Estos fármacos pueden actuar mejorando la síntesis de ATP al proporcionar electrones directamente a complejos de la cadena respiratoria que funcionan correctamente, o bien intentando mejorar la actividad de los complejos que no funcionan de forma correcta [73]. Entre éstos se encuentran: la riboflavina, vitamina que actúa como cofactor de los complejos I y II de la cadena respiratoria [74], la vitamina K3 (llamada también menadiona), vitamina liposoluble; la tiamina que actúa como cofactor de la piruvato deshidrogenasa, enzima mitocondrial que transforma el piruvato en acetil-CoA y que al oxidarse en el ciclo de Krebs libera cofactores reducidos (NADH y FADH₂); la creatina que actúa como reserva energética de grupos fosfato para fosforilar el ADP a ATP [75]; la carnitina que es una molécula que actúa como transportador de los ácidos grasos al interior de la mitocondria para que se produzca la beta-oxidación y regula las concentraciones de coenzima A libre intramitocondriales; el dicloroacetato que es un fármaco de estructura análoga a la del piruvato que actúa estimulando la actividad de la piruvato deshidrogenasa y aumentando el flujo de sustratos hacia la mitocondria.

Alternativamente se han utilizado también tratamientos antioxidantes en las enfermedades con disfunción mitocondrial. En general, estos fármacos tienen capacidad de reaccionar con los radicales libres, pasando de una forma reducida a otra oxidada y consiguiendo así disminuir el estrés oxidativo. Otros actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes, y otros tienen la capacidad de regenerar antioxidantes que están en forma oxidada (que no serían útiles para eliminar los radicales libres). Los fármacos con capacidad antioxidante empleados en el tratamiento de la disfunción mitocondrial son: Vitamina E o tocoferol; Vitamina A o retinol; Vitamina C o ascorbato; Vitamina K3 o menadiona; y MitoQ10; Idebenona; Ácido Lipoico; glutatión y CoQ [76-79]. El CoQ se ha empleado

extensamente para el tratamiento de la disfunción mitocondrial presente en numerosas patologías, tiene dos funciones básicas: actúa como aceptor móvil de electrones y protones, transfiriéndolos desde los complejos I y II hacia el complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial y como potente antioxidante en su forma reducida (ubiquinol), previniendo el daño oxidativo.

En la actualidad el proceso mitofágico es una de las dianas principales en la búsqueda de terapias efectivas de la disfunción mitocondrial. Aunque debemos tener presente que la mitofagia masiva puede tener un efecto perjudicial sobre la fisiopatología celular. La mitofagia masiva de mitocondrias disfuncionales supondría una pérdida de masa mitocondrial que provocaría la disrupción energética de la célula, lo que contribuiría a aumentar el daño mitocondrial y finalmente activaría el proceso de apoptosis. Por ello, el proceso mitofágico debe acompañarse de un aumento de la biogénesis mitocondrial que compense la pérdida de mitocondrias, evite el colapso energético y preserve la función mitocondrial y la homeostasis celular. Para ello, el uso de tratamientos que incidan positivamente en la biogénesis mitocondrial ofrece una gran potencial. Por ejemplo, mediante la regulación de PGC-1 α , un gen regulador esencial de la biogénesis mitocondrial, para restaurar la biogénesis mitocondrial y compensar el deterioro mitocondrial o para responder a un aumento de demanda energética. La biogénesis mitocondrial está altamente regulada por múltiples proteínas y factores de transcripción. Entre ellos, la proteína más importante es AMPK (proteína quinasa activada por AMP) y la consiguiente expresión de los factores de transcripción como PGC-1 α . La activación de PGC-1 α estimula su traslocación nuclear donde activa la transcripción de factores que regulan la expresión de las proteínas mitocondriales tales como NRF1 y NRF2 y de TFAM que regula la transcripción y replicación del ADN mitocondrial [80]. La AMPK tiene especial interés ya que funciona como sensor del estado bioenergético celular que puede activar la biogénesis mitocondrial. Cuando existen bajos niveles de ATP en la célula (debido, por ejemplo, a una disfunción de la función mitocondrial), aumenta el ratio AMP/ATP, lo cual aumenta la actividad quinasa de la AMPK que a su vez promueve la activación, entre otros, de PGC1- α . Además, AMPK estimula la actividad de SIRT1, lo que también afecta a la actividad de PGC1- α [81]. También

es importante destacar que además de sus funciones en la biogénesis mitocondrial, AMPK también participa en la respuesta celular al estrés oxidativo, aumentando la expresión de MnSOD y la catalasa [82]. Aunque la mitofagia y la biogénesis mitocondrial son procesos opuestos, están altamente relacionados y coordinados para determinar la función, estructura y homeostasis mitocondrial. De hecho, dichos procesos regulan la adaptación celular en respuesta a las disfunciones mitocondriales. En condiciones de falta de nutrientes o estrés celular, AMPK se activa y fosforila a la quinasa activadora de autofagia UKL-1, activándola y promoviendo la autofagia. De esta forma la activación de la AMPK es capaz de iniciar una respuesta dual que promueve tanto el recambio como la biogénesis mitocondrial [83] .

Coenzima Q₁₀

La Coenzima Q₁₀ es una molécula esencial que se encuentra en prácticamente todas las células del cuerpo humano. Debido a su naturaleza ubicua y su estructura de quinona, la CoQ se la conoce también como ubiquinona. Se encuentra en todas las membranas celulares y es especialmente conocida por su papel en la cadena de transporte de electrones en las membranas mitocondriales durante la respiración celular aeróbica. La CoQ ejerce como el principal transportador de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, desde los complejos I y II al complejo III y son necesarias unas adecuadas cantidades de CoQ para el correcto funcionamiento de la respiración celular y la producción de energía en forma de ATP. La CoQ también funciona como un potente antioxidante en las membranas celulares y en la sangre, donde ejerce sus propiedades antioxidantes en las lipoproteínas de alta y baja densidad [84].

La molécula de CoQ fue caracterizada por primera vez por en 1955 por Festenstein [85] y fue dos años después cuando Crane y colaboradores [86] la aislaron de las mitocondrias de corazón de ternera y observaron su capacidad en la regulación redox, así como su presencia en los complejos de la cadena de transporte de electrones. Karl Folkers y colaboradores de la compañía Merck, determinaron su

compleja estructura (2,3-dimetoxi-5-metil- 6-poliprenil-1,4 benzoquinona), tratándose de un lípido hidrofóbico compuesto por un anillo benzoquinónico doblemente hidroxilado en las posiciones 1,4, y unido en la posición 3 a una cadena lateral de isoprenos. En 1975 Mitchell [87] incluyó a la CoQ en su teoría quimiosmótica de la conversión de la energía, como componente esencial en la respiración celular. El número de unidades de isopreno que componen la cola hidrofóbica determina el tipo de coenzima Q. Así, nos podemos encontrar con 6 unidades (CoQ₆) en *Sacharomyces cerevisiae*, 8 unidades (CoQ₈) en *Escherichia coli*, 9 unidades (CoQ₉) en *Caenorabditis elegans* y 10 unidades (CoQ₁₀) en humanos [88]. Aunque la estructura química de la CoQ es similar a la de la vitamina K, la CoQ no se considera una vitamina, ya que es el único antioxidante soluble en lípidos que las células animales sintetizan de novo en el cuerpo (4). Hasta el momento ha sido identificado diez genes implicados en la regulación de la biosíntesis de la CoQ, los genes COQ.

La biosíntesis de CoQ comienza con la formación de ácido hidroxibenzoico al que se le une una cola lipídica poliisoprenoide. Esta molécula es el producto de dos vías biosintéticas diferentes: la síntesis de 4-hidroxibenzoato precursor del anillo de benzoquinona, derivado del metabolismo de la tirosina o fenilalanina y la síntesis de la cadena lateral de 10 isoprenos que comienza con la conversión de acetil-coenzima A a través de la ruta de mevalonato en farnesil pirofosfato y es ensamblada por la decaprenil difosfato sintasa, enzima responsable de determinar el número de unidades de isopreno que une a la cadena. Estas dos vías convergen en un paso final, donde 4-hidroxibenzoato y decaprenil pirofosfato son unidos mediante una reacción de condensación catalizada por la enzima decaprenil 4-hidroxibenzoato transferasa, originando una molécula intermediaria denominada decaprenil 4-hidroxibenzoato. Las posteriores modificaciones del anillo completarán la síntesis de la molécula de coenzima Q₁₀ (Figura 11).

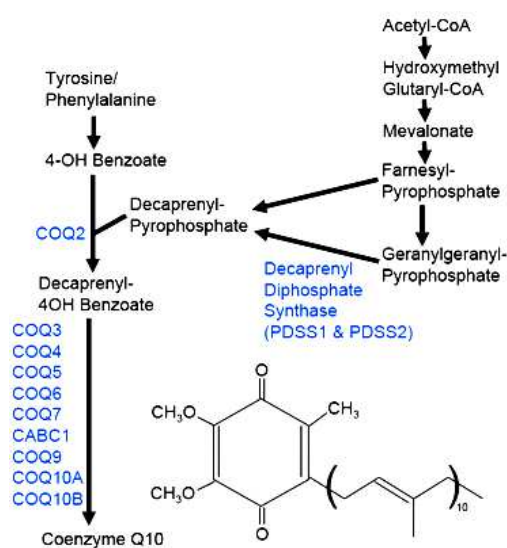


Figura 11 . **Biosíntesis de Coenzima Q₁₀**

La molécula de la CoQ presenta diferentes estados REDOX, se le denomina ubiquinona (CoQ) en su estado oxidado, presentando dos grupos cetónicos en posición *para*, que se transforma en un intermediario parcialmente oxidado, semiquinona (CoQH•) cuando se reduce uno de ellos aceptando un electrón dando lugar a un compuesto con un grupo cetona y un grupo hidroxilo, o ubiquinol (CoQH₂) en su estado reducido, cuando acepta los dos electrones, presentando dos grupos hidroxilo (Figura 12).

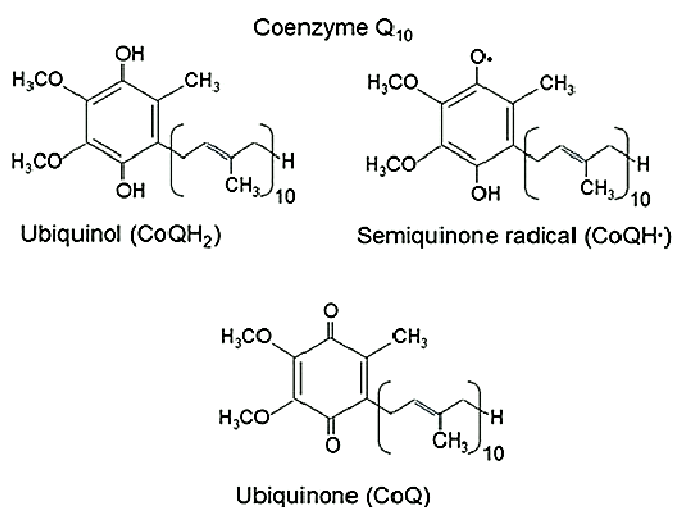


Figura 12 . **Estados REDOX de la Coenzima Q₁₀**

La CoQ en la membrana interna de la mitocondria, ejerce su función como principal transportador de electrones desde los complejos I y II al complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial. La CoQ también desempeña otras funciones en la mitocondria, como la de cofactor para la función de proteínas desacoplantes (UCPs) [89] de la membrana interna mitocondrial. La CoQ estabiliza la apertura de MPTP [90], cuya apertura daría lugar a la pérdida del $\Delta\Psi_m$ potencial de membrana mitocondrial. Son muchos los procesos patológicos implicados donde el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estrés oxidativo es consecuencia común de la disfunción mitocondrial y la deficiencia de CoQ [91].

La alteración de la cadena de transporte electrónico mitocondrial incrementa la generación de especies reactivas de oxígeno, ya que los electrones se acumulan en las primeras fases de la CTE y pueden ser donados directamente al oxígeno molecular dando lugar al anión superóxido mitocondrial. La mitocondria dañada o alterada puede producir altos niveles de especies de oxígeno reactivas (ROS): anión superóxido (O_2^-) e hidroxilo ($\cdot OH$), y por la generación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que es una especie reactiva del O_2 y puede ser precursora de radicales libres, este incremento de ROS contribuye al deterioro celular. El estrés oxidativo puede ocurrir como resultado de un aumento de la producción de ROS o una disminución de la protección antioxidante contra los ROS. La mitocondria es la mayor generadora de ROS en la célula [35]. La producción de ROS por las mitocondrias puede conducir a daño oxidativo y la peroxidación que acontece en la membrana mitocondrial afecta a los componentes proteicos de la cadena transportadora de electrones (CTE). El daño oxidativo mitocondrial también puede aumentar la tendencia de las mitocondrias para liberar proteínas al espacio intermembrana, como el citocromo c al citosol y de ese modo activar la maquinaria apoptótica de la célula. En consecuencia, no es sorprendente que daño oxidativo mitocondrial contribuye a una amplia gama de patologías.

La CoQ protege también del daño oxidativo al DNA mitocondrial, especialmente sensible a los ROS producidos constantemente en la mitocondria. La ROS promueven reacciones de oxidación que dañan y degeneran macromoléculas, como el DNA, proteínas y lípidos de membrana. La forma reducida del CoQ, el

ubiquinol, es un potente antioxidante capaz de proteger a los lípidos de membrana y a las lipoproteínas plasmáticas de la peroxidación lipídica [92].

Otras funciones de gran importancia para el metabolismo celular que ejerce la CoQ, son actuando en la membrana plasmática como estabilizador del sistema antioxidante encargado de proteger a las células de agresiones externas [93]. Además el CoQ ejerce su función antioxidante regenerando otras moléculas con esta actividad, como el α -ascorbato o el tocoferol [93].

La CoQ además de su función antioxidante desempeña otros papeles en las membranas de los lisosomas, la membrana plasmática y en el retículo endoplasmático. Las membranas lisosomales contienen altas concentraciones de CoQ [94]. La CoQ induce cambios en la propiedades físico químicas de los lisosomas [84, 94]. La CoQ también juega un papel clave en el intercambio de electrones en la membrana lisosomal, contribuyendo a la translocación protones y a la acidificación del medio intralisosomal [95]. La acidificación es esencial para la correcta función proteolítica de las hidrolasas lisosomales, ya que las enzimas lisosomales ejercen su función óptima a un pH ácido, lo que significa que requieren un suministro permanente de protones.

La exposición de la membrana plasmática de estímulos que provoquen estrés, produce la elevación intracelular del esfingolípido ceramida pudiendo desencadenar procesos apoptóticos en la célula [96]. El CoQ reducido o ubiquinol puede actuar como un eficaz regulador de los niveles de ceramida [97] y, proteger de la apoptosis celular. La CoQ también interviene en la inactivación de la caspasa-3, presumiblemente disminuyendo los niveles de ceramida [98, 99]. Además las ceramidas pueden alterar a las mitocondrias elevando el estrés oxidativo e induciendo una mitofagia letal [100].

Numerosos estados patológicos se asocian con un aumento del estrés oxidativo y la acumulación de proteínas mal plegadas pudiendo afectar el correcto funcionamiento de la célula y desencadenar el llamado “estrés del retículo endoplasmático”, los cuales a su vez están relacionados con la activación de la respuesta inflamatoria [101]. Se ha comprobado que la CoQ contribuye a reducir el

estrés oxidativo, puede modular el estrés del retículo endoplasmático y la respuesta inflamatoria [102].

La presencia ubicua de la CoQ en las membranas celulares donde desempeña numerosas funciones celulares, puede ser la causa de la gran diversidad de estados patológicos que presentan deficiencia de CoQ en humanos. La adición exógena de CoQ además de actuar sobre la mitocondria, se distribuye a otros compartimentos celulares, que incluyen a la membrana plasmática, el retículo endoplasmático y los lisosomas[103]. El tratamiento con CoQ es ampliamente utilizado, debido a su importante papel en el metabolismo energético. Otros efectos beneficiosos del tratamiento con CoQ incluyen: la mejora del transporte de electrones y la producción de ATP, protección antioxidante, regulación en la señalización redox y, la estabilización del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial y la protección contra la autofagia y la apoptosis celular [64, 65, 104, 105] .

La CoQ también ejerce un impacto sobre la regulación en la expresión génica lo que podría explicar su efecto sobre el metabolismo en distintos tejidos del organismo [106, 107]. La regulación de los niveles fisiológicos endógenos de la CoQ está determinada por factores relacionados con la actividad oxidativa (5,6), por su biosíntesis y de su utilización por el organismo. Estos niveles están alterados en diversas enfermedades, entre las que destacan las enfermedades cardiovasculares y los trastornos musculares degenerativos (8).

Diversos estudios han mostrado los efectos terapéuticos del tratamiento con CoQ produciendo múltiples efectos fenotípicos, que pueden explicarse por su efecto en la regulación de la expresión de muchos genes implicados principalmente en la señalización celular, en el metabolismo intermediario, en el control del transporte, la transcripción y la inflamación, indicándonos un importante papel en la regulación génica (2,9). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que la CoQ induce estos efectos pleiotrópicos aún no se han entendido por completo (3).

Numerosos procesos patológicos están asociados con la deficiencia de CoQ y pueden beneficiarse del tratamiento con CoQ, incluyendo las deficiencias primarias y secundarias de CoQ, las enfermedades mitocondriales, las enfermedades lisosomales, la fibromialgia, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades

neurodegenerativas, el cáncer, la diabetes mellitus, la infertilidad masculina y la enfermedad periodontal. Las deficiencias de CoQ en muestras de tejido o los bajos niveles séricos de CoQ mostrados en una amplia gama de condiciones patológicas que incluyen las deficiencias primarias de CoQ, (10), las deficiencias secundarias detectadas en las enfermedades mitocondriales, lisosomales y neurodegenerativas (11). Además los niveles de CoQ disminuye en edades avanzadas y estos bajos niveles de CoQ podrían contribuir a las manifestaciones del envejecimiento (12). Las deficiencias de CoQ puede ser resultado: (1) a deficiencias nutricionales (por ejemplo la deficiencia de la vitamina B6, un cofactor esencial para la biosíntesis de CoQ, (2) un defecto genético o adquirido en la ruta de biosíntesis de CoQ o que provoquen una mayor degradación, (3) por el aumento requerido por algunos tejidos para satisfacer sus necesidades metabólicas en una enfermedad en particular. EL déficit de CoQ está relacionado con cardiomiopatías, degeneración muscular y neuronal. La deficiencia severa de CoQ causa un conjunto de síntomas clínica y genéticamente muy heterogéneos, entre los que se encuentran: encefalomiopatía, enfermedad multisistémica infantil severa, nefropatía, ataxia cerebelosa, síndrome de Leigh con retraso en el crecimiento y miopatía. La administración oral de CoQ puede ayudar que se logren adecuados niveles tisulares, con la posibilidad de corregir la deficiencia de CoQ, lo que hace su tratamiento particularmente adecuado en estas graves encefalopatías infantiles.

La deficiencias primarias de CoQ, es aquella producida por algún defecto en los genes implicados en su síntesis, genes COQ y las deficiencias secundarias, las causada por otros defectos genéticos. [108].

Entre las deficiencias secundarias de CoQ, se incluyen enfermedades causadas por mutaciones en genes no relacionados con la biosíntesis de ubiquinona, por ejemplo mutaciones en el gen de la aprataxina (APTX), que causan ataxia y apraxia oculomotora [109], en el gen ETFDH, que codifica para la flavoproteína transportadora de electrones implicada en la transferencia de electrones, causando miopatía con acumulación de lípidos y disfunción de la cadena respiratoria o mutaciones en el gen BRAF, causando el síndrome cardio-facio-cutáneo [110].

Se han descrito deficiencias de CoQ y su utilización en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson [111-113], el Alzheimer [114, 115], la enfermedad de Huntington [115, 116] o la ataxia de Friedreich [117, 118], donde existen disfunción mitocondrial [119] asociada a altos niveles de ROS y daño oxidativo, por lo que el uso de coenzima Q está tomando cada vez más relevancia en enfermedades y estados patológicos asociados con disfunción mitocondrial.

Se ha demostrado la presencia de deficiencia de CoQ en los pacientes con fibromialgia que se asocia a una disfunción mitocondrial con aumento de los niveles de peroxidación lipídica en las células mononucleares de la sangre periférica. La disfunción mitocondrial se asoció con un aumento de ROS [120] y aumento en la expresión de genes implicados en la autofagia y la mitofagia [121]. Además, el tratamiento con CoQ actuó positivamente sobre la inflamación, aumentando la producción de las enzimas antioxidantes celulares y la activación de AMPK, un sensor de la energía celular.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que la CoQ₁₀ tiene un potencial efecto terapéutico en la disfunción mitocondrial y las alteraciones del proceso autofágico. Además la activación de AMPK, actúa sobre la biogénesis mitocondrial, aumentando la expresión del gen regulador PGC-1 α , [122]. Recientemente, se ha demostrado que la activación de AMPK reduce los niveles de GlcCer en fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Gaucher [123]. Igualmente, se ha demostrado que el tratamiento con CoQ inhibe la iniciación de la peroxidación lipídica en la aterosclerosis [92] y tiene un papel antiaterogénico en ratones deficientes en apolipoproteína E (apoE^{-/-}) [124]. Además el tratamiento con CoQ fue capaz de aumentar los niveles de enzimas antioxidantes y reducir el marcador inflamatorio IL-6 en pacientes con aterosclerosis [125, 126]. Además la deficiencia de CoQ puede utilizarse como un potencial biomarcador del estado de la función mitocondrial.

En pacientes con enfermedades mitocondriales es frecuente la presencia de deficiencia de CoQ asociada a miopatía mitocondrial [127]. A su vez, el tratamiento con CoQ se ha utilizado hace décadas en pacientes con trastornos mitocondriales primarios [128] como el síndrome MELAS [129] y el síndrome

MERRF [130]. El tratamiento con CoQ ha corregido las alteraciones celulares en una gran variedad de alteraciones mitocondriales primarios [64, 65, 131].

Se ha encontrado deficiencia de CoQ en diversos trastornos lisosomales como la esfingolipidosis de Niemann-Pick asociado [132] y en pacientes con mucopolisacaridosis [133] y su tratamiento se ha utilizado en células de pacientes con la enfermedad lisosomal de Sanfilippo [134].

DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL PRIMARIA: SÍNDROME MERRF

La disfunción mitocondrial primaria es causada por mutaciones en genes del ADN mitocondrial (mtDNA), o del ADN nuclear (nDNA) que codifican para una proteína mitocondrial y provocan directamente defectos en el metabolismo oxidativo mitocondrial. Estos desordenes mitocondriales primarios o enfermedades mitocondriales constituyen un amplio y heterogéneo conjunto de patologías raras de origen genético (Tabla 1) debidas a un defecto mitocondrial primario caracterizado, en la mayor parte de los casos, por un trastorno de la fosforilación oxidativa [135].

Recordemos que la fosforilación oxidativa depende de la expresión coordinada de los genomas mitocondrial y nuclear. Este doble control genético de la funcionalidad mitocondrial da lugar a distintos patrones de herencia de las enfermedades mitocondriales y, por tanto, complica su caracterización y diagnóstico. Las enfermedades mitocondriales son trastornos neurodegenerativos, crónicos y progresivos con manifestaciones fenotípicas y grados de afección variable [136]. La prevalencia de las enfermedades mitocondriales es de aproximadamente 1:5000 entre la población a nivel mundial [137].

A nivel celular, la patogénesis de estos desordenes tiene su origen en un estado crónico de insuficiencia energética debido a la incapacidad de las mitocondrias afectadas de generar suficiente ATP mediante el sistema OXPHOS y a un aumento del estrés oxidativo por el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la mitocondria [138].

A menudo estas citopatías mitocondriales presentan un patrón multisistémico, siendo los tejidos con una fuerte demanda energética como el cerebro y el músculo, los órganos que aparecen afectados con mayor frecuencia.

Sintomatología dominante Síntomas neurológicos	Entidades Síndrome de Leigh Neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP) Epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas (MERRF) Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica, episodios similares a accidentes vasculares (MELAS) Síndrome de Kerans-Sayre (KSS) Neuropatía gastrointestinal con encefalopatía (MNGIE) Síndrome de Alpers Neuropatía óptica hereditaria (LHON) Sordera neurosensorial (SHNL) y sordera neurosensorial inducida por aminoglicósidos (AID) Otras encefalopatías
Miopatías	Miopatías esqueléticas Miopatías oculares (incluye ptosis y/o oftalmoplejia progresiva (CPEO))
Cuadros clínicos extraneurológicos y multiorgánicos	Miocardiopatías Síndrome de Pearson Diabetes mitocondrial Síndrome de Wolfram Hepatopatías Alteraciones gastrointestinales Nefropatías Alteraciones endocrinas Alteraciones cutáneas Alteraciones oculares Otras

Tabla 1. **Clasificación de enfermedades mitocondriales según sus características clínicas más frecuentes**. Tomado de de P Sanjurjo - 2008 Inborn errors of metabolism as rare diseases with a specific global situation." Una clasificación amplia de mutaciones del mtDNA asociadas a distintos fenotipos puede encontrarse en <http://www.mitomap.org/MITOMAP>

La secuenciación del genoma mitocondrial humano publicado en 1981 [139], permitió la identificación de numerosas mutaciones puntuales causantes de enfermedades humanas y hereditarias [140]. Esto supuso un gran avance en el diagnóstico y comprensión molecular de múltiples enfermedades mitocondriales [141].

Entre las mutaciones que puede presentar el mtDNA, podemos distinguir dos tipos. En primer lugar, mutaciones puntuales, que pueden afectar a uno de los 13 genes

que codifican para proteínas en el mtDNA o bien a los dos genes que codifican para ARN ribosómico (rRNA) o los veintidós que codifican para ARN transferente (tRNA) que afectará de forma global a la síntesis de proteínas. En segundo lugar, podemos encontrar grandes deleciones, inserciones o duplicaciones en el mtDNA que dan lugar a diferentes patologías (Figura 7).

De entre todos los tipos de mutaciones conocidos, las mutaciones en los genes que codifican para el tRNA mitocondrial son las más comunes, y muchas de ellas están asociadas a una gran variedad de patologías que cursan con miopatía, pérdida auditiva, encefalopatía y cardiomiopatía [142].

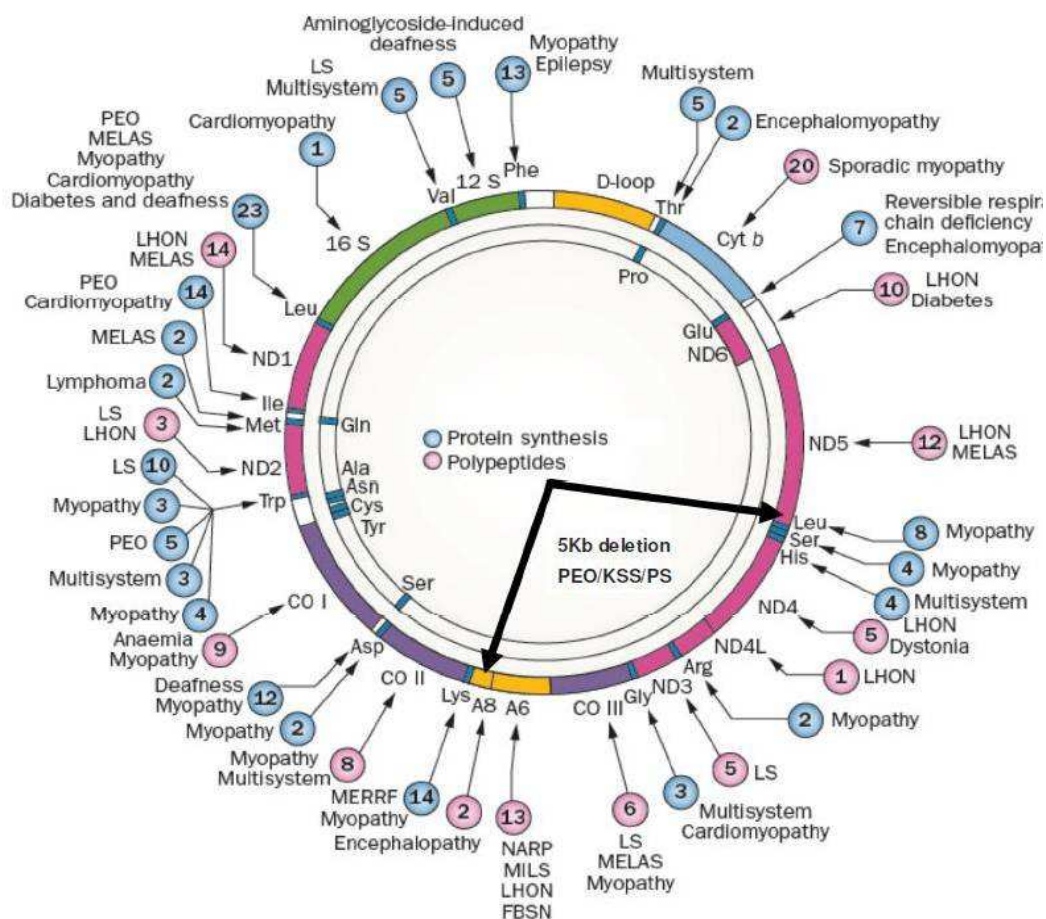


Figura 13. ADN mitocondrial y enfermedades mitocondriales asociadas.

Las enfermedades mitocondriales son clínicamente heterogéneas debido a la distribución desigual de las mutaciones en los tejidos, al grado de heteroplasmia de los tejidos afectados, la segregación mitótica y a la variabilidad de penetrancia y del efecto umbral de las distintas mutaciones [143]. La *penetrancia* es la probabilidad de que se presente un fenotipo determinado, dado que se posee un genotipo particular. La *expresividad* se refiere al grado de manifestación de un fenotipo determinado. Si una enfermedad presenta varios grados de manifestación (heterogeneidad clínica) se dice que es de expresividad variable. Generalmente presentan herencia materna, ya que depende de genes localizados en las mitocondrias. Las mitocondrias del cigoto proceden del óvulo, por lo que sólo las mujeres transmiten las mutaciones en el DNA mitocondrial. A la complejidad intrínseca de la enfermedad, debido a su naturaleza poligénica, se le suma la complejidad de la genética mitocondrial. Cada célula tiene centenares de mitocondrias y cada mitocondria posee de 8 a 10 cadenas dúplex de DNA mitocondrial, calculándose unas 5.000 copias de DNA mitocondrial por genoma diploide. Las dos cadenas de cada molécula son codificantes, sin intrones en sus genes, pudiéndose distinguir entre una cadena “pesada” y una “ligera”, según su composición nucleotídica, que se transcriben en un gran RNA policistrónico a la manera de los organismos procariotas. Las moléculas de DNA mitocondrial que, en un individuo normal, son iguales entre sí (homoplasmia). Sin embargo, en los pacientes con enfermedades mitocondriales las moléculas de DNA mitocondrial mutado, coexisten con el mtDNA no mutado (heteroplasmia) y dentro de un mismo individuo pueden encontrarse distintos grados de heteroplasmia en los diferentes tejidos y suele darse la necesidad de alcanzar un umbral de porcentaje de DNA mutado (efecto umbral) para que empiecen a manifestarse los efectos patológicos de la mutación [144]. Cuando las células se dividen mitóticamente, las mitocondrias se reparten al azar (segregación mitótica) entre las dos células hijas, provocando que la proporción de ellas mutadas varíe de una célula a otra. Ello explica la expresividad tan variable en su intensidad y extensión histológica de este grupo de procesos, entre los que se halla la epilepsia mioclónica con fibras rojo rasgadas (MERRF). Además del efecto por las mutaciones específicas del DNA

mitocondrial, existen genes nucleares, codificantes de proteínas con funciones mitocondriales, que modulan el efecto de las mutaciones mitocondriales hereditarias, implicando manifestaciones clínicas distintas, lo que hace muy difícil establecer una prognosis para el paciente.

SÍNDROME MERRF

La epilepsia mioclónica asociada con fibras rojas rasgadas o síndrome MERRF es una enfermedad con disfunción mitocondrial primaria. Fue descrito por primera vez N. Fukuhara y cols. [145] en 1980, en dos pacientes que mostraban convulsiones generalizadas, problemas mentales, atrofia muscular. En la biopsia muscular encontraron acumulación de mitocondrias alteradas o fibras rojas rasgadas (Figura 14).

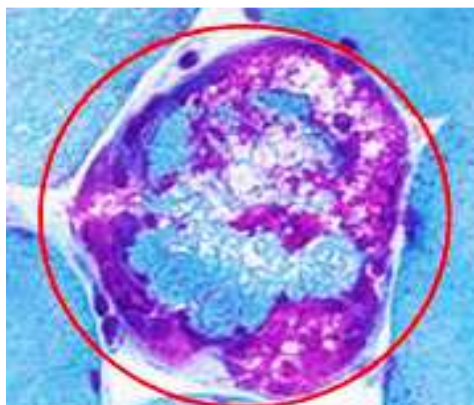


Figura 14. **Fibras rojo rasgadas en el síndrome MERRF**

La mutación más común relacionada con este síndrome, que supone un 80% de los casos, es la transición de una adenina a una guanina en la posición 83444 en el gen *MT-TK* del genoma mitocondrial (m.8344A>G) que codifica para el tRNA^{Lys}. Aunque, también se han identificado otras mutaciones minoritarias en el mismo gen para tRNA^{Lys} o en genes que codifican para tRNAs diferentes, en pacientes con la enfermedad de MERRF [146, 147].

La mutación m.8344A>G dificulta las modificaciones de la base U de balanceo en el anticodón del tRNA^{Lys} [148], entorpeciendo la traducción de los codones AAA y

AAG (Figura 15), lo que resulta en una incorporación alterada de los aminoácidos a las proteínas sintetizadas en la mitocondria [149]. Otros factores propuestos que también influyen en la síntesis alterada de proteínas mitocondriales son: trastornos en el procesamiento de los mRNA, cinética de la aminoacilación incorrecta de los tRNA^{Lys} [150].

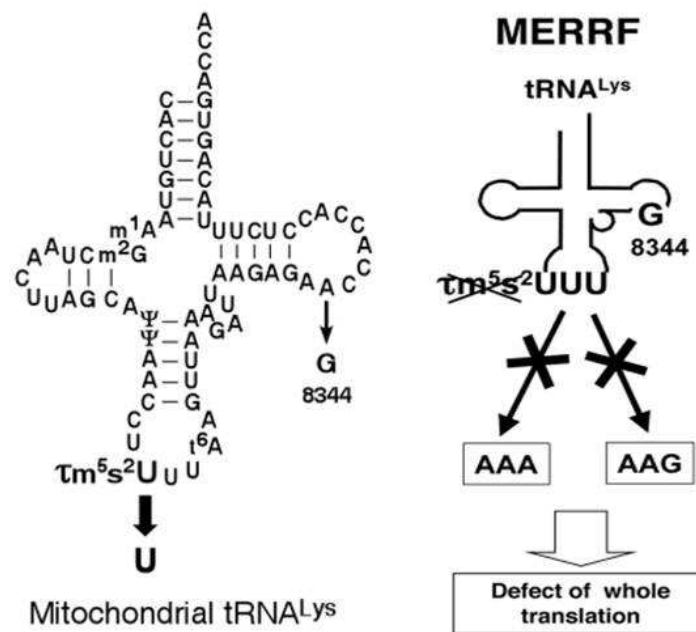


Figura 15. **Posible mecanismo causado por la mutación m.8344A>G dificultando la modificación 5-taurinomethyl-2-thiouridine (m⁵s²U), de la base U de balanceo.** “Tomado de Y Kirino - 2005 Human Mitochondrial Diseases Associated with tRNA Wobble Modification Deficiency”

En esta enfermedad existe una deficiencia generalizada en la síntesis de proteínas mitocondriales, una disminución de la actividad de las enzimas de la CRM y graves defectos respiratorios [151, 152]. Estas alteraciones muestran en los pacientes disminución de los complejos I y IV de la CRM, baja tasa de respiración celular y disminución del $\Delta\Psi\text{m}$ [152, 153]. En presencia de una cadena respiratoria disfuncional las mitocondrias no son capaces de producir suficientes cantidades de ATP. Esto conduce a un estado crónico de deficiencia energética, debido a un desequilibrio entre los requerimientos energéticos y la energía disponible. Finalmente este desequilibrio energético causa daño celular y tisular.

Un alto grado de heteroplasmia con la mutación m.8344A> G en las células, se correlacionan con una deficiencia en la síntesis de proteínas, una disminución del consumo de oxígeno, y la deficiencia de citocromo c oxidasa [151], y acumulación de péptidos anormales debido a la terminación prematura de la traducción [150], el péptido anormal mayoritario, denominado pMERRF, corresponde a una forma truncada de la subunidad 1 de la Citocromo c oxidasa, mientras que los otros se identificaron como fragmentos N-terminales de la subunidad 2 de la NADH deshidrogenasa (complejo I). Todo estos datos sugieren que la mutación MERRF m.8344A>G inhibe directamente la síntesis de proteínas mitocondriales [154].

Además, el aumento del estrés oxidativo por una disfuncional CRM, provoca daño tisular y desempeña un papel crucial en la patogénesis y progresión en pacientes con la enfermedad de MERRF [155].

Es una enfermedad rara caracterizada clínicamente por mioclonías, epilepsia, ataxia, miopatía mitocondrial y fibras rojas rasgadas [156]. Estos síntomas distingue clínicamente al síndrome MERRF del resto de las enfermedades mitocondriales; sin embargo, las manifestaciones clínicas relacionadas a esta enfermedad son de carácter multisistémico. Otros síntomas adicionales son, baja estatura, demencia, pérdida de audición, disfunción tubular renal, atrofia óptica, acumulación de lípidos, cardiomiopatía y neuropatía periférica [157, 158].

El síndrome MERRF, es una enfermedad con disfunción mitocondrial primaria, provocada directamente por una mutación del DNA mitocondrial. Sin embargo no se conocen con claridad como las mutaciones de mtDNA causan el daño celular y los mecanismos compensatorios que activa la célula para sobrevivir. Al igual que muchas enfermedades mitocondriales, no hay cura para el síndrome MERRF, y el tratamiento es principalmente sintomático.

DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL SECUNDARIA: LA ENFERMEDAD DE GAUCHER

La disfunción mitocondrial secundaria es la causada por la alteración de otros procesos celulares fuera de las mitocondrias. Como ejemplo de disfunción mitocondrial secundaria tenemos, el daño por isquemia/reperfusión, la sepsis, las enfermedades neurodegenerativas, el síndrome metabólico, el cáncer, las enfermedades autoinmunes y la diabetes [159]. Se ha encontrado alteraciones mitocondriales, en numerosas enfermedades lisosomales como en la enfermedad de Batten [160], la Mucopolipidosis tipo IV [161], la Mucopolipidosis IIIA [polidistrofia pseudo-Hurler] y Tipo II o enfermedad de células de inclusión, la Lipofuscinosis neuronal ceroides tardía infantil, la Mucopolisacaridosis VI y la Gangliosidosis GM1 entre otras. Las alteraciones mitocondriales incluyen la sustitución de la red mitocondrial tubular por un alto número de mitocondrias despolarizadas y redondeadas [162].

Las enfermedades lisosomales son un heterogéneo grupo de enfermedades raras hereditarias (Tabla 2) de aproximadamente cincuenta enfermedades con pérdida de función de enzimas lisosomales, en las que se encuentran defectos en múltiples niveles de la síntesis y degradación de las hidrolasas lisosomales. Entre estos defectos se encuentran alteraciones de la síntesis y plegamiento de las proteínas, defectos de la activación, defectos en los sustratos y defectos en las proteínas asociadas con la membrana del lisosoma. La continua captación lisosomal de material que no puede degradar por la falta de enzimas hidrolíticas funcionales desemboca en la acumulación progresiva de material no digerido en los lisosomas. Ello afecta a su función y provoca un metabolismo anormal que genera una cascada de eventos secundarios que alteran la función celular y de otros orgánulos como la mitocondria[162]. Todas estas alteraciones provocan fenotipos clínicos que incluyen visceromegalia, patologías neurológicas, y muerte prematura.

Lipidosis
Esfingolipidosis
Glicoesfingolipidosis
Por depósito de GlcCer
– Enfermedad de Fabry
– Enfermedad de Gaucher
– Gangliosidosis GM 1
– Gangliosidosis GM 2
Por depósito de GalCer
– Leucodistrofias (MLD, Krabbe)
Otras esfingolipidosis
Niemann Pick A,B y C
Enfermedad de Farber
SAP deficiencia
Otras enfermedades por depósito de lípidos.
Enfermedad de Wolman
Enfermedad por almacenamiento de esteres de colesterol
Mucopolisacaridosis
Formas I - IX
Glucogenosis
Enfermedad de Pompe
Enfermedad de Danon
Glucoproteinosis
Aspartilglucosaminuria
α -fucosidosis
Galactosialidosis
Manosidosis α y β
Enfermedad de Schindler
Sialidosis
Lipofusinos neuroceroideas
Infantil (CLN1), infantil tardía (CLN2), juvenil (CLN3), adulto (CLN4), otras (CLN5 a 8)
Mucopolidosis
Tipo II (I-cell disease)
Tipo IIIA (pseudo-Hurler)
Tipo IIIC
Tipo IV
Otras
Cistinosis
Acúmulo de ácido siálico libre infantil
Enfermedad de Salla
Mucosulfatidosis (defecto múltiple de sulfatasas)

Tabla 2 .**Clasificación de las enfermedades lisosomales en función del material acumulado.**
P Sanjurjo - 2008 “Inborn errors of metabolism as rare diseases with a specific global situation.”

Las alteraciones en el proceso autofágico en las enfermedades lisosomales pueden producir efectos patológicos que empeoren el estado fisiológico celular [163]. Recordemos que la fusión de autofagosoma con el lisosoma era la etapa final del proceso autofágico, por tanto la disfunción de este componente clave perjudicaría el funcionamiento del control de calidad celular, interfiriendo en un normal reciclaje celular. Además la función lisosomal es esencial para el mecanismo de la regulación del control de calidad mitocondrial y mantener así una correcta función

mitocondrial. La reducción del flujo autofágico (tasa a la cual son degradados los autofagosomas) asociada a una disfunción lisosomal, pueden afectar a la reciclaje normal de mitocondrias envejecidas o dañadas, acumulándose mitocondrias disfuncionales, incrementando la producción de ROS, aumentando el estrés oxidativo y aumentando aún más la disfunción mitocondrial [66] y el daño celular.

LA ENFERMEDAD DE GAUCHER

La enfermedad de Gaucher causada por mutaciones en el gen GBA1 que resultan en una enzima β -glucocerebrosidasa defectuosa, genera un metabolismo anormal de varios sustratos que no se degradan y se acumulan progresivamente en los lisosomas, afectando a su función y secundariamente a otros orgánulos como las mitocondrias. La disfunción mitocondrial asociada a la enfermedad de Gaucher se ha constatado recientemente [164-166]. La enfermedad de Gaucher (EG), debe su nombre por haber sido descrita por el médico francés Philippe George Ernst Gaucher en 1882. A mediados del siglo XX, se describió que se trataba de una enfermedad genética de carácter autosómico recesivo y cuya anomalía de base se hallaba localizada en el cromosoma 1 (1q2.1) [167]. Años más tarde, en 1965, las investigaciones de Brady [168] demostraron que la enfermedad de Gaucher estaba producida por el déficit de la enzima lisosomal β -glucocerebrosidasa, responsable de la hidrólisis intracelular de la glucosilceramida y otros esfingolípidos afines. Sus estudios posteriores sobre la TRE [169, 170] supuso una gran avance en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher y otras enfermedades lisosomales. Aunque la TRE supuso una revolución a principio de los 90's, ha mejorado la calidad de vida de los pacientes, pero no es capaz de resolver todos los problemas que plantea la enfermedad ni prevenir complicaciones. Este déficit enzimático tiene su origen en un defecto a nivel del gen GBA 1 que codifica la enzima lisosomal glucocerebrosidasa (GCasa) que cataliza la hidrólisis de glucosilceramida (GlcCer), por lo tanto el defecto funcional de dicha enzima provocará el acúmulo de GlcCer en el interior del lisosoma. La saposina C es un cofactor que ayuda a la GCasa a solubilizar los lípidos.

La enfermedad de Gaucher es la enfermedad lisosomal más predominante. Está causado por mutaciones en el gen GBA1 que resultan en una enzima β -glucocerebrosidasa defectuosa o de insuficiente actividad. Muchas de estas mutaciones conducen a defectos significativos en el plegamiento de la proteína durante la traducción en el retículo endoplasmático (RE), dando como resultado una reducción del transporte de la enzima al lisosoma (degradación mediada por la maquinaria celular de control de calidad). La enzima GCasa mal plegada es eliminada por medio de un proceso denominado degradación asociada al retículo endoplasmático o ERAD (del inglés, *Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*). Durante este proceso, las enzimas mal plegadas serán exportadas fuera del retículo hacia el citoplasma para ser posteriormente degradadas por el sistema de ubiquitinación proteosoma. La disminución de su actividad catalítica provoca la acumulación de glucosilceramida y glucosil-esfingolípidos en los lisosomas (Figura 16) de macrófagos del sistema reticuloendotelial (dando un aspecto particular a estas células cargadas, de lípidos, denominadas células de Gaucher como se muestra en la figura 17 y en órganos viscerales).

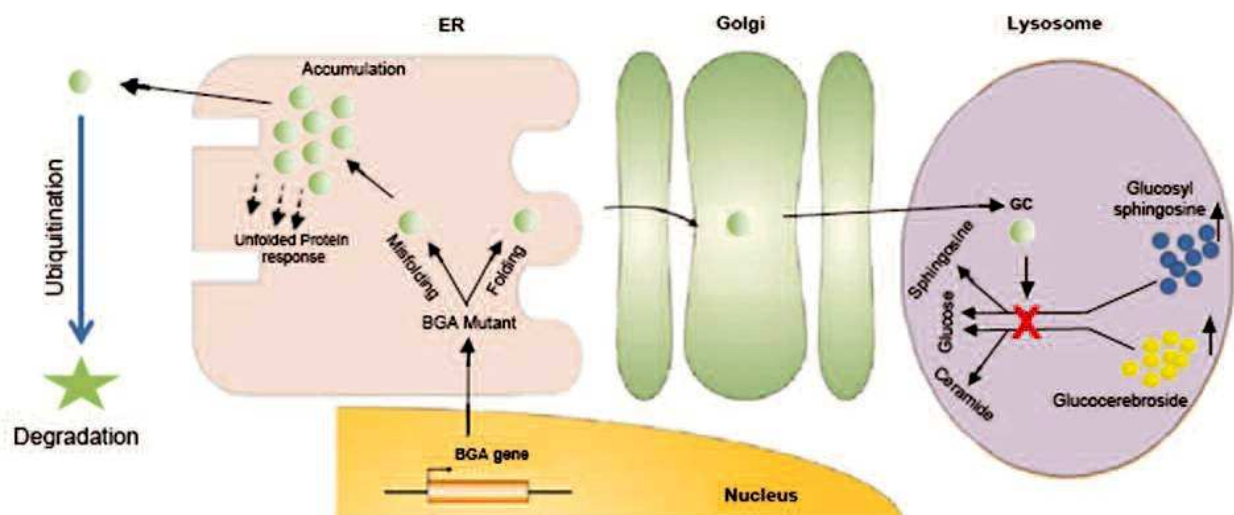


Figura 16 . Degradación de la enzima GCasa mal plegada por la maquinaria celular de control de calidad y acumulación de glucosilceramida y glucosil-esfingolípidos en los lisosomas.

La enfermedad de Gaucher se subdivide en 3 tipos basados en la edad que comienza a manifestarse la enfermedad y la afectación del sistema nervioso central (SNC). Los pacientes con la enfermedad lisosomal de Gaucher sin manifestaciones del SNC son clasificados como tipo I, mientras que aquellos pacientes con manifestaciones neurológicas se clasifican en los tipos II y III [171]. La enfermedad manifiesta afectación visceral, hematológica y neurológica, caracterizada clínicamente por hepatoesplenomegalia. Necrosis óseas por infarto. Fracturas óseas, osteopenia, anemia, cardiopatía, enfermedad cardiopulmonar, o síndromes neurodegenerativos. Además, las mutaciones en el gen GBA1 son un factor de riesgo para la enfermedad de Parkinson y demencia con cuerpos de Lewy [172, 173]. Los defectos subyacentes como la alteración de la autofagia y la disfunción mitocondrial de estas enfermedades, sugiere una posible relación mecanicista con la fisiopatología de la enfermedad de Gaucher [174].

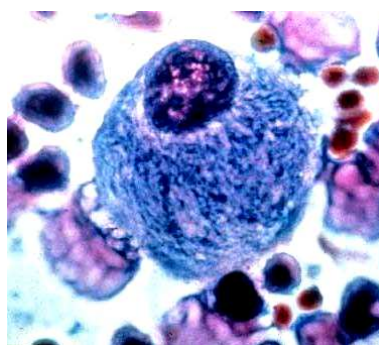


Figura 9. **Célula de Gaucher.**

La enfermedad de Gaucher está clasificada como una Esfingolipidosis. Los esfingolípidos, componentes habituales de las membranas biológicas, se consideraron, hasta hace aproximadamente dos décadas, como meros integrantes estructurales y estáticos de las membranas biológicas. Estructuralmente su base es una ceramida (N–acil-esfingosina) y unida a oligosacaridos forma los distintos glucoesfingolípidos y su catabolismo requiere de la acción de varias enzimas hidrolíticas y de varios cofactores activadores (saposinas). La deficiencia de una de estas enzimas o de sus cofactores da lugar a distintas patologías clínicas, como la enfermedad de Gaucher (Figura 9). Los esfingolípidos regulan diferentes procesos de la actividad celular: autofagia [175], apoptosis, senescencia, diferenciación y el

ciclo celular. Experimentos realizados mediante la adición exógena de ceramidas en cultivos celulares, causa disfunción mitocondrial, caracterizado por la inhibición de la CRM, disminución del $\Delta\Psi_m$, la generación de ROS con el consiguiente estrés oxidativo y mitofagia. Además causa la apertura del poro de MPTP, produciendo apoptosis [176]. La disfunción mitocondrial y elevado estrés oxidativo se ha observado en diferentes patologías lisosomales, como en la enfermedad de Niemann-Pick tipo C , que acumula colesterol y esfingolípidos [177]. También se observado, disfunción de la CRM, la disminución de los complejos I,IV y V en otras esfingolipidosis como la enfermedad de Fabry [178]. Otros grupos han investigado sobre el papel de las ceramidas en la activación de la autofagia [179] y además se ha demostrado que las ceramidas inducen mitofagia letal [180] . Todos estos datos proporcionan la idea que existe una relación al menos indirecta entre la acumulación de esfingolípidos, alteración de la autofagia y la disfunción mitocondrial. Además la inhibición química irreversible con Conduritol beta epóxido de la enzima glucocerebrosidasa, aumenta los niveles intracelulares de esfingolípidos en modelos celulares, eleva los niveles de ROS y causa disfunción mitocondrial [164].

En la actualidad la enfermedad de Gaucher dispone de terapias que siguen dos estrategias terapéuticas principales: terapia de reducción de sustrato (TRS), que se caracteriza por la inhibición de la enzima implicada en la producción del sustrato que se acumula, y la terapia de reemplazo enzimático (TRE), que administra de forma exógena la enzima recombinante activa que se encuentra defectuosa, la TRE supone un alto coste económico y no es muy eficaz para los casos que muestran implicación del sistema nervioso central ya que las enzimas recombinantes no atraviesan la barrera hematoencefálica [181]. De este modo, existe un gran número de pacientes para los cuales no existe tratamiento o la efectividad del mismo es muy baja. Los fármacos de aplicación TRS tienen mayor potencial para penetrar hasta el SNC y producir beneficios a nivel neuronal. Es el caso de N-butyl-1-deoxynojirimycin (NBDNJ, Miglustat, Zavesca®), que actúa como un inhibidor débil de la glucosilceramida sintasa, reduciendo la biosíntesis de glucosilceramida. Miglustat ha sido aprobado únicamente para el uso en pacientes Gaucher tipo I, de

gravedad leve a moderada, pero no para el caso de pacientes de los tipos II y III [182]. Además, muchos pacientes tratados con Miglustat han experimentado efectos secundarios que incluyen diarrea, pérdida de peso y temblores [183]. Se han encontrado más de 350 mutaciones en el gen GBA1, la mutación N370S y L444P son las que se presentan con mayor frecuencia [184]. Cuatro mutaciones (N370S, L444P, 84GG, IVS2+1) justifican aproximadamente el 90% de los alelos mutantes causantes de la enfermedad en la población de judíos asquenazíes [185]. En las poblaciones no judías, los mismos cuatro alelos explican aproximadamente el 50-60% de los alelos mutantes causantes de la enfermedad. En Europa las mutaciones más frecuentes son L444P, con un 38% de los casos, seguida de N370S con el 33% de los casos. Actualmente no existe consenso sobre la relación genotipo-fenotipo, excepto para los pacientes con al menos un alelo N370S, lo que aparentemente garantiza protección neurológica y la presencia de L444P que es característico de las formas con afectaci [186]. La mutación L444P, resulta en un incorrecto plegamiento de la GCasa en el RE y fallos en su transporte al lisosoma. Pacientes en homocigosis para la mutación L444P presentan formas neurológicas severas de la enfermedad. La mutación es un cambio de base 1448T>C en el gen GBA1 que da lugar a la sustitución del aminoácido lisina por prolina en la posición 444 en la cadena polipeptídica, localizada en uno de los dominios no catalíticos de la enzima glucocerebrosidasa (GBA). La mutación L444P/L444P suele manifestar un fenotipo clínico con afectación neurológica grave [187], Este tipo tiene afectación visceral, hematológica y neurológica, caracterizada clínicamente por hepatoesplenomegalia variable, Necrosis óseas por infarto. Fracturas óseas, osteopenia, anemia, cardiopatía, o Insuficiencia respiratoria y por una encefalopatía progresiva acompañada de apraxia oculomotora, epilepsia mioclónica y ataxia [188]. Si bien el desencadenante primario de la fisiopatogenia de estas enfermedades es el depósito o material sin degradar en el lisosoma, los mecanismos en que esa acumulación genera las alteraciones celulares, tisulares y orgánicas, y en última instancia las manifestaciones clínicas, es un tema que requiere aún de investigación.

Chaperonas farmacológicas

Actualmente, una estrategia terapéutica emergente para el tratamiento de enfermedades de depósito lisosomal, ha sido el desarrollo de compuestos capaces de unirse al sitio activo y estabilizar el plegamiento apropiado [189] de las enzimas sintetizadas en el retículo endoplasmático (Figura 18), pudiendo actuar como “chaperonas farmacológicas” (CF) que facilitan el transporte de la forma catalíticamente activa a los lisosomas, estos compuestos con actividad de chaperona farmacológica, es de particular interés para aquellas manifestaciones clínicas de la enfermedad que involucran al sistema nervioso central [190]. Recientemente se ha propuesto esta estrategia para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher [191]. Las CFs también tienen el potencial de atenuar la respuesta de la proteína mal plegada y prevenir el estrés asociado al retículo endoplasmático (ER) que puede desencadenar procesos apoptóticos en la células y respuestas inflamatorias [192] .

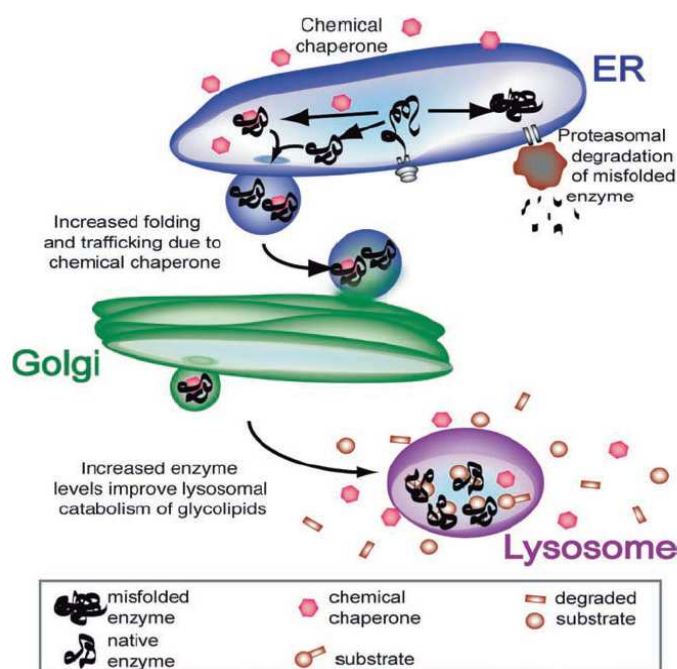


Figura 18. **Terapia con chaperonas farmacológicas (CFs)** Tomada de AR Sawkar - 2006 “Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders – a focus on Gaucher disease”

Una importante ventaja de las CF es que son pequeñas moléculas que pueden ser administradas por vía oral, incluyendo la capacidad para atravesar la BHE, lo que

las convierte en un potencial tratamiento para enfermedades de depósito lisosomal con afectación del sistema nervioso central [193]. Algunos inhibidores de las enzimas glicosidasas implicadas en enfermedades lisosomales son capaces de unirse al sitio activo y estabilizar el plegamiento apropiado, pudiendo actuar como “chaperonas farmacológicas” que facilitan el transporte de la forma catalíticamente activa a los lisosomas [194]. De este modo, el desarrollo de compuestos con actividad de chaperona farmacológica se ha postulado como una posible estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades lisosomales, de particular interés para aquellas manifestaciones clínicas de la enfermedad que involucran al sistema nervioso central. Como ejemplos de chaperonas farmacológicas actualmente en estudio se pueden citar los derivados de iminoazúcares como la 1-desoxinojirimicina, la isofagomina, los derivados de iminoazúcares sp2 como la NAdB-AIC y otros compuestos no relacionados con los iminoazúcares como el trans-4-(2-amino-3,5- dibromobencilamino)ciclohexanol (ambroxol).

El hecho de que la mutación L444P/L444P se encuentra en un dominio no catalítico de la GCasa hace a la enzima particularmente refractaria a los tratamientos disponibles, incluida la terapia de chaperonas farmacológicas (TCF), por lo que existe la necesidad urgente de desarrollar estrategias terapéuticas que sean útiles, en particular, en enfermos con este genotipo, en la literatura solo recoge algunos compuestos que han producido efectos beneficiosos en esta mutación [195-197]. Recientemente, se ha descrito que los iminoazúcares sp2 bicíclicos derivados de L-idonojirimicina, relacionados con la calistegina [198, 199], se comportan como CFs en fibroblastos humanos de Gaucher homocigotos para la mutación L444P, aumentando la actividad glucocerebrosidasa y el tráfico de la enzima a los lisosomas. Uno de los candidatos más prometedores iminoazúcares sp2 dentro de esta familia de CFs es la NAdBT-AIJ (N-[N'-(4-adamantan-1-ilcarboxamidobutil)tiocarbamoilo]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina) [200]. Un menor coste de producción [199], la posibilidad de administración oral y la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica son ventajas que presenta esta terapia para la enfermedad de Gaucher, en especial para los tipos II y III.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Reactivos.

Los anticuerpos monoclonales Anti-Actina, Anti α -Tubulina, Anti-VDAC/Porina fueron adquiridos en la casa comercial Sigma Chemical Co. (Sigma, St Louis, MO, USA). También pertenecen a esta casa los reactivos 2,6-Dicloroindofenol sodio hidratado (DCPIP), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), Triton, Acetil CoA, Oxalacetato, BSA-EDTA, CoQ1, Rotenona, KCN, Succinato, Antimicina A, Citocromo C, tripsina (0,25% Trypsin-EDTA Solution), MO). Uridina, Bafilomicina A1, Nonil-Acridina Orange (NAO). Los fluorocromos 5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (CM-H₂DCFDA) BODIPY 581/591 C11, MitoTracker Red CMXRos, LysoTracker Red DND-99 special packaing y MitoSox™, Hoechst 33342, C11-BODIPY(581/591), éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM) y MitoTracker Green FM (MTG) fueron adquiridos de Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR). Los reactivos Immun Star HRP substrate kit y iScript™ cDNA Synthesis Kit fueron adquiridos a BioRad Laboratories (Hercules). SYBR Premix Ex Taq™ (Takara) fue adquirido de la casa BioMol Internacional. El producto Cóctel de inhibidores de proteasas fue adquirido de Boehringer Mannheim (Indianapolis). Los anticuerpos Anti-active caspase-3, Anti MAP LC3, Anti-BECLIN1, Anti-caspasa 3 y Anti ATG12 fueron obtenidos de la casa comercial Cell Signalling Technology (Beverly, USA). Anti- Citocromo C se obtuvo de PharMingen (BD Bioscience, San José, CA). Anti-GAPDH monoclonal antibody, clone 6C5, se adquirió de la casa Research Diagnostic, Inc. (Flanders, NJ). Anti-hAtg5 fue adquirido de Biosensis (South Australia, Australia). Los anticuerpos anti-catalasa (H-300), anti-PDI (H-160), anti-Golgi marker (AE-6), anti-LAMP-1 and anti-Cathepsin D, fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos monoclonales específicos para los complejos de la fosforilación oxidativa (Complejo I, II, III y IV) se adquirieron en Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR). El anticuerpo anti-GCsa (ab55080) se obtuvo de Abcam (Massachusetts, US). El anticuerpo anti-GlcCer rabbit fue obtenido de la casa

Glycobiotech GmbH (Kukels, Germany). Los Glucocerebrósidos (Glucosilceramida) se adquirió en Matreya LCC (Pleasant Gap, PA, USA). Endoglicosidasa-H se obtuvo de New England Biolabs (Hitchin, UK). Los anticuerpos secundarios usados en la microscopía de fluorescencia fueron los correspondientes a la serie Alexa Fluor IgG (H+L), (488nm, 546nm, 555nm; Molecular Probes, USA).

5.2 Líneas celulares.

En este proyecto hemos trabajado con fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF portadores de la mutación 8344A>G con distinta heteroplasmia. Estas células fueron cedidas por la Doctora Sandra Jackson del Hospital Universitario Carl Gustav Carus, Dresden (Alemania). Tanto las muestras de pacientes como las de fibroblastos control fueron obtenidas siguiendo los Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos acordados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial de 1964 revisado en 2001. Los fibroblastos de pacientes con el síndrome MERRF portadores de la mutación 8344A>G, usados en este estudio fueron denominados como MERRF-1 con una heteroplasmia de un 57%, MERRF-2 y MERRF-3 con una heteroplasmia de un 35% y 8% respectivamente. Los fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Gaucher portadores en homocigosis para la mutación L444P, fueron adquiridos en Coriell Cell Repositories (Camden, New Jersey, USA), fueron denominados como, Gaucher-A, Gaucher-B y Gaucher-C. Los cultivos de fibroblastos humanos de pacientes MERRF, Gaucher y de pacientes control se cultivaron en medio D-MEM 4500 mg/L de Glucosa, L-Glutamina, Piruvato (Invitrogen) suplementado con solución de antibióticos (Sigma Chemical Co.) y 20% de suero fetal bovino (FBS, Sigma). Se utilizaron cíbridos transmitocondriales cedidos por la Dra. Elena García Arumi del Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, que se crearon a partir de líneas celulares que carecen de mtDNA (rho0) derivadas de una línea celular deficiente en timidin kinasa(143TK-) descrito por King y Attardi [30], que se repueblan con mitocondrias exógenas (con mtDNA) mediante la fusión con células de pacientes con la mutación MERRF8344A>G. Se utilizaron cíbridos transmitocondriales que

poseen un fondo nuclear común y mtDNA portador de la mutación MERRF 8344A>G (MERRF_ 99%) y (MERRF_0%) como línea control. Los cultivos de híbridos se cultivaron en medio D-MEM 4500 mg/L de Glucosa, L-Glutamina, Piruvato (Invitrogen) suplementado con antibióticos (Sigma Chemical Co.), 5% de suero fetal bovino (FBS, Sigma) y Uridina a 50 ng/mL (Sigma). Los cultivos de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) y noqueados para Atg5(-/-), fueron cedidos por Noboru Mizushima, Tokyo Medical and Dental University, Japan[201], se mantuvieron con medio D-MEM 4500 mg/L de Glucosa, L-Glutamina, Piruvato (Invitrogen) suplementado con antibióticos (Sigma Chemical Co.), 10% de suero fetal bovino (FBS, Sigma).

5.3 Extracción de CoQ de los cultivos celulares.

Las células se recogen con tripsina (0,25% Trypsin-EDTA Solution, Sigma), y se centrifugan a 800g durante 5 minutos y el pellet obtenido se resuspende en 500 μ L de PBS y se pasa a un tubo de vidrio de 15 mL con tapón de rosca (Pirex), al que se añade Q9 como estándar interno de la extracción, cuya concentración debe ser conocida determinándose por espectrofotometría a una longitud de onda de 275nm (ϵ CoQ9 = 14,7mM⁻¹). La solución celular con el estándar interno se mantiene en hielo 5 minutos para después añadir 500 μ L de SDS 2% y agitar con un vortex durante un minuto a potencia máxima. A continuación se añaden 2 mL de una mezcla etanol:isopropanol 95:5 y se mezcla con vortex durante un minuto. Posteriormente se añaden a la mezcla 5 mL de hexano y se agita de nuevo con vortex, pasando a centrifugar a 1000 g durante 5 minutos a 4°C para separar la fase orgánica superior (compuesta por los lípidos) de la fase soluble. Tras esta centrifugación, la fase orgánica se transfiere cuidadosamente con el uso de pipetas Pasteur a una ampolla de rotavapor de 25 mL, volviendo a repetirse la extracción con el hexano por dos veces más. El hexano de las ampollas se seca en un rotavapor (R- 3000, B·U·CHI), en condiciones de vacío, a 40°C y con una potencia de rotor del 40%. El residuo seco se reconstituye en 333 μ L de etanol (calidad HPLC) y se pasa a un tubo eppendorf limpio, repitiendo el proceso dos

veces más. El etanol se evapora por vacío (Savant SpeedVac) durante 2-3 horas a 50°C, tras lo cual el residuo seco será guardado - 20°C, para finalmente ser reconstituido en el volumen adecuado de fase móvil antes de la medida cromatográfica.

5.4 Determinación de los niveles de CoQ por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El proceso de separación de los componentes lipídicos se lleva a cabo en un HPLC Shimadzu UFLC, equipado con una columna sílica de fase reversa 15-cm Kromasil C-18, con horno a 40°C, flujo de fase móvil 1mL/min y composición metanol:isopropanol (60:40) y 1,42 mM perclorato de litio. Los niveles de CoQ se analizan por detectores ultravioleta 15 (System Gold 168) y electroquímico (Coulochem III ESA). Las muestras se reconstituyen en 200 µL de fase móvil y se cargan 20 µL en el HPLC tras una línea base de fase móvil y los estándares de CoQ necesarios; Q10 para humanos y Q9 como estándar interno. Los datos obtenidos son referidos a mg de proteínas de la muestra recogida.

5.5 Análisis enzimático de la actividad de los complejos de la Cadena 5.5.1 Respiratoria Mitocondrial

5.5.1 Preparación de las células para dosificación de Cadena Respiratoria Mitocondrial

La monocapa celular se lava con PBS, se recogen las células con tripsina (0,25% Trypsin-EDTA Solution, Sigma) y se centrifugan durante 10 minutos a 800 g. El pellet se lava con PBS y se resuspende por vortex. Se repite el lavado 2 veces más. El pellet se resuspende en 1mL de Tampón A (MOPS 20mM, Sacarosa 0,25M) y se transfiere la solución a un eppendorf, al que se añaden 500 µL de digitonina 0,2mg/ml. Tras dejar reposar 5 minutos en hielo, se centrifuga a 5000 g durante 3 minutos en frío. El pellet se resuspende por vortex en 500 µL de Tampón B (MOPS

20mM, Sacarosa 0,25M, EDTA 1mM) y se deja reposar nuevamente en hielo durante 5 minutos, tras los cuales se centrifuga a 10000 g durante 3 minutos en frío. Desechado el sobrenadante, se resuspende el pellet en 200 μ L de Tampón KP 10mM pH 7,4. Para proceder al análisis de la cadena respiratoria, el homogenado debe sonicarse 10 segundos a potencia 30% (Sonicador Bandelin Sonoplus).

5.5.2 Determinación de proteínas para dosificación de actividad de Cadena Respiratoria por Método de Lowry modificado

Para determinar la concentración de proteínas del homogenado celular se usó el método colorimétrico de Lowry [202]. Para ello se realizó una dilución 1/15 de la suspensión celular y, siempre por duplicado, se procedió a medir en espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu) 200 μ L de la muestra diluida, agua destilada en el caso del blanco, en 1000 μ L de Lowry, tras vortearlo, dejarlo en oscuridad 10 minutos y añadirle 100 μ L de Folin. Se vortea y se deja en oscuridad 30 minutos antes de su lectura a 550 nm.

5.5.3 Análisis enzimático de actividad de Cadena Respiratoria Mitocondrial a partir de homogenado de células

La actividad enzimática de la cadena mitocondrial se determinó por métodos espectrofotométricos[203], con un espectrofotómetro con UV-1800 (Shimadzu) célula peltier acoplada (PCB 150, Water Peltier System, Shimadzu).

5.5.3.1 Citrato sintasa

Siempre por duplicado, se añade a la cubeta en el siguiente orden:

Tris-HCl 0,75M pH 8;	100 μ l	75mM
DTNB 1mM;	100 μ l	100 μ M
Triton 1%	100 μ l	10,1%
Acetil CoA (7mg/ml)	50 μ l	350 μ g/ml

Homogenado	5 μ l	
Agua destilada	595 μ l	

Agitar e incubar 2 minutos a 30°C, y añadir:

Oxalacetato 10mM	50 μ l	0,5mM
------------------	------------	-------

Agitar, incubar 30 segundos a 30°C y leer durante 2 minutos a 412 nm a 30°C.

Cálculos: $\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} (\text{Abs}/\text{min}) = \text{Abs} / \text{min}$ con Oxalacetato

5.5.3.2. Complejo I – NADH CoQ Oxidorreductasa

Por orden se añade a la cubeta:

Tampón KP 40mM pH8	500 μ l	120mM
NADH 1mM	200 μ l	0,2mM
NaN3 50mM	20 μ l	1mM
BSA-EDTA 1%	100 μ l	
Homogenado	40 μ l	
Agua destilada	130 μ l	

Agitar e incubar 8 minutos a 30°C, para leer la línea base (LB) a 340nm a 30°C.

Una vez leída la LB añadir:

CoQ1 10mM 10 μ l

Agitar, incubar 30 segundos a 30°C y leer 2 minutos a 340nm. Después añadir 20 μ l de Rotenona 0,25mM y leer durante 2 minutos a 340nm.

Cálculos: $\epsilon = 6,81 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} (\text{Abs}/\text{min}) = \text{Abs} / \text{min}$ con CoQ1

5.5.3.3. Complejo II - Succinato deshidrogenasa

Por orden se añade a la cubeta:

Tampón KP 100mM pH7	500 μ l	50mM
KCN 30Mm	50 μ l	1,5mM
DCPIP 1mM	100 μ l	0,1mM
Homogenado	20 μ l	
Agua destilada	230 μ l	

Agitar e incubar 2 minutos a 30°C, para después añadir:

Succinato 320mM	100µl	32mM
-----------------	-------	------

Agitar, incubar 30 segundos a 30°C y leer 2 minutos a 600nm, para luego añadir:

CoQ1 10mM	5µl	5µM
-----------	-----	-----

Cálculos: $\epsilon = 19 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Actividad SDH: se usa el _ de la reacción del succinato

Actividad Complejo II: se usa el _ de la reacción con el CoQ1

5.5.3.4. Complejo III: DBH2 – Citocromo C Oxidorreductasa

Cada muestra se analizará en paralelo con Antimicina y sin Antimicina.

Tampón KP 100mM pH7,5	500µl	50mM
-----------------------	-------	------

NaN3 50mM	40µl	2mM
-----------	------	-----

BSA-EDTA 1%	100µl
-------------	-------

± Antimicina A (1mg/ml EtOH 50%) 10µl

Agua destilada 285µl en la cubeta con Antimicina

259µl en la cubeta sin Antimicina

DBH2 10mM	5µl	50µM
-----------	-----	------

Agitar y leer la línea base durante 2 minutos a 30°C y 550nm. Entonces añadir:

Homogenado	10µl
------------	------

Agitar y leer 2 minutos a 30°C y 550nm:

CoQ1 10mM	5µl	5µM
-----------	-----	-----

Cálculos para actividad sensible a Antimicina:

$\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} = \text{Abs} / \text{min sin Antimicina} - \text{Abs} / \text{min con Antimicina}$

5.5.3.5. Complejo I + III: NADH – Citocromo C – Reductasa

En el siguiente orden se añade a la cubeta:

Tampón KP 100mM pH7,5	550µl
-----------------------	-------

Citocromo C 1mM	100µl
-----------------	-------

KCN	30µl
-----	------

Homogenado 10 μ l

Agua destilada 210 μ l

Agitar y leer la línea base durante 2 minutos a 30°C y 550nm, para después añadir:

NADH 1mM 100 μ l

Agitar y leer 2 minutos a 30°C y 550nm

Cálculos: $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} (\text{Abs}/\text{min}) = \text{Abs} / \text{min}$ con NADH

5.5.3.6. Complejo II + III: Succinato – Citocromo C – Reductasa

En el siguiente orden se añade a la cubeta:

Tampón KP 100mM pH7,5 550 μ l

Citocromo C 1mM 100 μ l

KCN 30 μ l

Homogenado 30 μ l

Agua destilada 190 μ l

Agitar y leer la línea base durante 2 minutos a 30°C y 550nm, para después añadir:

Succinato 30mM 100 μ l

Agitar y leer 2 minutos a 30°C y 550nm

Cálculos: $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} (\text{Abs}/\text{min}) = \text{Abs} / \text{min}$ con succinato

5.6. Análisis de proteínas por Western Blotting

5.6.1. Extracción y Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Los cultivos celulares con los distintos tratamientos se levantaron con tripsina y se centrifugaron, a los pellets celulares obtenidos, se les añadió tampón de lisis pH 7,4 (Tris-HCl 10 mM, pH 6.8, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM y Tritón X-100 al 1%) suplementado con inhibidores de proteasas “Complete Mini” (Boehringer 60422001) y se incubaron las muestras por 5 min a 4°C. Para la determinación de la cantidad de proteínas, se aplicó una modificación del método colorimétrico de Bradford [204] para muestras que contengan membranas [205]. El ensayo se

realiza, por duplicado, añadiendo en una cubeta de espectrofotómetro 50 μ L de NaOH 1M, entre 2-5 μ L de la muestra y 1 mL de reactivo de Bradford. Después de dejar incubar la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz, se mide la absorbancia a 595 nm en un espectofotómetro UV-1800 (Shimadzu). La cantidad de proteína se determinó mediante una recta patrón realizada previamente al reactivo Bradford con cantidades conocidas (0-28 μ g) de inmunoglobulina G. Los homogeneizados se recuperaron en tubos Eppendorf y centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 min a 4°C. El extracto proteico se desnaturalizó en tampón SDS-PAGE (Tris-base pH 6.8 0.25 M, glicerol 35%, β -mercaptoetanol 20%, azul de bromofenol 0,02% y SDS 10%) a 95°C por 5 min.

5.6.2. SDS-PAGE y Western-Blotting

El análisis de proteínas presentes en las muestras celulares lisadas se realizó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), según el procedimiento descrito por Laemli [206]. La separación de proteínas se resolvió en un sistema MiniProtean III (BioRad) y con tampón de electroforesis (Tris/Glycine/SDS, BioRad), se separaron las proteínas en geles de acrilamida/bis acrilamida (BioRad), donde el gel condensador y separador se fabricaron al 4 y 12,5%, respectivamente. La electroforesis de las proteínas se realizó a 120 V en tampón de electroforesis TGS-BioRad (Tris/Glicina/SDS). Realizada la electroforesis, se realizó una transferencia a membrana mediante el sistema Trans-Blot (SD, Semi-Dry Transfer Cell con fuente de alimentación BioRad Power Pac 1000) a voltaje constante 25 V y durante 45 minutos en tampón de transferencia TG (Tris/Glycine, BioRad). Se usaron membranas de Nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham Biosciences) y de Fluoruro de polivinilideno PVDF (Immobilon Transfer Membranes, Millipore). Una vez finalizada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se tiñó con una solución de Rojo Ponceau al 0.5% en ácido acético al 1% para comprobar la eficiencia de la transferencia. Tras desteñir el rojo de Ponceau con ácido acético 1% las membranas se bloquearon con TTBS (Tris 20mM

pH 7.6, NaCl 150 mM+Twenn20 0,05%) + Leche en polvo al 0,5% a temperatura ambiente durante 1 hora.

5.6.3. Cuantificación de los niveles de glucosilceramida: Dot-Blotting

El método de “dot-blot” para la determinación de los niveles de Glucosilceramida modificado de [207]. La metodología empleada consistió principalmente en la activación de la membrana PVDF con metanol durante 20 segundos, las membranas se bloquearon con TTBS (Tris 20mM pH 7.6, NaCl 150 mM+Twenn20 0,05%+ Leche en polvo al 0,5%) a temperatura ambiente durante 1 hora. Para aumentar la sensibilidad se centrifugaron las muestras a 11.000 g durante 60 min. Las muestras se colocaron directamente sobre una membrana de polivinildifluoruro PVDF quedando las moléculas adsorbidas a la misma. En cada membrana se cargaron 60 µg total de proteína se realizó una primera incubación con un antisuero policlonal específico de la GlcCer durante 2 horas en TTBS (Tween-20 al 0,05%, agua destilada y leche en polvo) y posteriormente secadas la menbranas, se incubaron con el anticuerpo secundario (conjugado con peroxidasas de rábano HRP) durante 2 horas en TTBS. La reacción se evidenció mediante un sustrato quimioluminiscente, usando el Kit comercial Immun-Star HRP Chemiluminiscent (BioRad Laboratories) y películas fotográficas CL-XposureTM Film (Clear Blue X-Ray Film, Pierce). La evaluación de la reacción se realizó mediante densitometría utilizando el software imageJ.

5.6.4. Inmunodetección con anticuerpos y electrotransferencia de proteínas

Las membranas ya bloqueadas se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C en TTBS, (TBS, Tween-20 al 0,05%, agua destilada y leche en polvo). Posteriormente las membranas se lavaron tres veces durante 15 min en TTBS (TBS, Tween-20 al 0,05%, agua destilada). Luego, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario durante(marcado con peroxidasas de rábano HRP para catalizar la oxidación del luminol en presencia de peróxido de

hidrógeno) 2 h en TTBS, Tween-20 al 0,05%, agua destilada y leche en polvo. La detección de la proteína se realizó por quimioluminiscencia usando el Kit comercial Immun-Star HRP Chemiluminiscent (BioRad Laboratories) y películas fotográficas CL-XposureTM Film (Clear Blue X-Ray Film, Pierce).

5.7. Determinación de los niveles de ATP

Los niveles de ATP presentes en células fueron determinados mediante la utilización del kit ATP Determination (Molecular Probes), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Este método está basado en la cuantificación de la luminiscencia producida en la conversión de luciferasa en luciferina, en presencia de ATP. Las células fueron lisadas, y los extractos celulares sonicados, centrifugados para eliminar restos celulares y cuantificada la cantidad de proteína. Una vez obtenido el extracto, se procedió a la medida de los niveles de ATP por medio del luminómetro modelo Luminoskan TL Plus de Thermo Lab systems. Para la cuantificación de los niveles de ATP, se generó una recta de calibrado a partir de muestras de ATP de concentración conocida.

5.8. Estudio del potencial de membrana mitocondrial, ($\Delta\Psi_m$) y cuantificación de mitocondrias despolarizadas.

Para el estudio del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), se siguieron diferentes estrategias. En primer lugar, las células fueron cultivadas en cubreobjetos de 22x22 mm, (Menzel-Gläser), usando placas de 6 pocillos y fueron incubadas durante 15 minutos a 37°C con MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes) a una concentración de 100 nM, seguidos de dos lavados de 30 min con medio de cultivo fresco a 37°C. El estudio del $\Delta\Psi_m$ se llevó a cabo por análisis de microscopía de fluorescencia, mediante cuantificación de la señal usando software de análisis de imagen DeltaVision (Applied Precision) y citometría de flujo. En segundo lugar se incubaron las células con TMRM un indicador dependiente del $\Delta\Psi_m$ a una concentración de 20nM y MitoTracker Green FM (MTG), fluorocromo independiente de $\Delta\Psi_m$ e indicador de la masa mitocondrial, a una concentración

de 100nM(Molecular Probes), por un periodo de 15 min seguidos de dos lavados de 30 min con medio de cultivo fresco a 37°C. Las células se recogieron con tripsina, se resuspendieron en medio D-MEM sin suero y fueron analizadas a las longitudes de onda de excitación-emisión de cada flurocromo, según instrucciones del fabricante, y posterior análisis en citómetro de flujo (BD FACSCalibur).

La cuantificación de mitocondrias, se llevó a cabo clasificándolas en tubulares y polarizadas (con una longitud $>5\mu\text{m}$) y cuando esta red se fragmenta da lugar a mitocondrias predominantemente esféricas (longitud $<5\mu\text{m}$) y con menor $\Delta\Psi\text{m}$ (mitocondrias despolarizadas). La cuantificación de la forma y medición de la señal de fluorescencia se determinó en 100 células usando software de análisis de imagen imajeJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

5.9. Microscopía de fluorescencia y estudios de colocalización.

Las células fueron cultivadas en cubreobjetos estériles de 22x22 mm, (Menzel-Gläser), en placas de 6 pocillos. Después de los tratamientos específicos para cada caso, las células fueron lavadas con PBS y a continuación fijadas con una mezcla 3,8% paraformaldehído en agua + NaOH 10 μM + PBS 20X (62,4 μl /ml), durante 5 min a temperatura ambiente; posteriormente fueron permeabilizadas con saponina al 0,1% durante 5 minutos y se lavaron 3 veces con PBS+Tween-20 (0,05%). Las muestras ya preparadas para la inmunotinción se incubaron durante 1 hora a 37° en presencia del anticuerpo primario (dilución 1:100 en PBS+Tween-20 (0,05%)). Pasado el tiempo de incubación se lavaron las células 3 veces con PBS+Tween-20 (0,05%) y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario (1 hora a 37°, dilución 1:100 en PBS+Tween-20 (0,05%)). Tras lavar nuevamente con PBS+Tween-20 (0,05%) se tiñeron los núcleos con Hoechst 33342 (Invitrogen, Molecular Probes, USA) a una concentración 1mg/ml en PBS durante 5 minutos, se lavaron y finalmente, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos de microscopía utilizando Vectashield como medio de montaje, (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) y se analizaron mediante microscopio de fluorescencia, (Leica DMRE, Leica Microsystems GmbH, Alemania Wetzlar.), ó Microscopio

Olympus IX-71 con objetivos de 100x/1.35NA, (NA=Apertura numérica), y de 60x/1,40NA. Finalmente los diferentes fluorocromos fueron detectados y visualizados mediante la correcta combinación de filtros seleccionados para cada caso. Los estudios de colocalización se analizaron con el software DeltaVisionssystem (Applied Precision; Issaquah,) que permite calcular mediante el coeficiente de correlación de Pearson, la colocalización entre los distintos marcadores.

5.10. Estudios de deconvolución, Z-Stacks

Las deconvoluciones y estudios 3D de imágenes tanto de la células fueron desarrollados utilizando un sistema Delta Vision, (Applied Precision; Issaquah, WA), con un microscopio Olympus IX-71 con objetivos de 100x/1.35NA, (NA=Apertura numérica), y 60x/1,40NA con los que se tomaron las imágenes a tratar según su caso, de tal modo que para las deconvoluciones se realizaron 10 ciclos/imagen en el modo Conservative ratio Method para así eliminar en lo máximo posible planos de desenfoque y obtener la mayor resolución y nitidez posibles de cada imagen. En cuanto a los Z-Stacks, éstos se realizaron mediante cortes o secciones de entre 0,2-0,5 μm de espesor en todos los canales posibles de cada preparación para así tener una mayor información relativa a cada punto y a cada plano en cuestión para finalmente poder hacer reconstrucciones tipo 3D con el mayor realismo posible de cada célula, elemento ó estructura estudiada realizándose a su vez a cada corte la deconvolución correspondiente mediante el uso del software Softworx Software Algorithm, (de Applied Precision), Conservative Ratio Method, aplicando 10 ciclos o iterations en cada caso.

5.11. Cuantificación de la tasa de proliferación celular

Se cultivaron y contabilizaron las células en presencia y ausencia de los distintos tratamientos. Pasado el tiempo necesario y tras desechar las células muertas retirando el medio de cultivo y reemplazándolo por medio fresco, las células fueron contadas usando un microscopio invertido con objetivo 40X (Olympus

IX71) en cuatro campos distintos elegidos al azar. Los resultados se expresan en número de células/ cm².

5.12. Cuantificación de células apoptóticas

La cuantificación de células apoptóticas se realizó mediante el análisis por microscopía de fluorescencia de la fragmentación o condensación de los núcleos mediante tinción con el marcador nuclear Hoechst 33342 (Molecular Probes), activación de la caspasa 3 y la liberación del Citocromo c. En todos los casos, la cuantificación se realizó en más de diez campos elegidos aleatoriamente.

5.13. Cuantificación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales.

La producción específica de ROS mitocondriales en la células fue medido con MitoSOX™ (Invitrogen, Molecular Probes), un indicador fluorescente rojo específico de la cantidad de los niveles del anión superóxido O₂⁻ mitocondrial. Las células in vivo son permeables al reactivo MitoSOX™ que de forma rápida y selectiva es dirigido a la mitocondria. Dentro de la mitocondria, el reactivo MitoSOX™ es oxidado por los superóxidos y entonces emite fluorescencia roja. Se sembraron 1x10⁶ células que fueron incubadas con MitoSOX 1μM a 37°C en oscuridad, por un periodo de 15 min seguidos de dos lavados de 30 min con medio de cultivo fresco a 37°C. También se determinó la masa mitocondrial con el uso de 10-N-nonil naranja de acridina (NAO) a una concentración de 10 μM por un periodo de 10 min a 37°C en oscuridad, sonda fluorescente se une específicamente a la cardiolipina presente en la membrana mitocondrial, independientemente del ΔΨm, pudiendo marcar de manera específica las mitocondrias y poder así referir las medidas realizadas a la cantidad de mitocondrias. Las células se recogieron con tripsina, se resuspendieron en medio D-MEM sin suero y fueron analizadas a las longitudes de onda de excitación-emisión del fluorocromo, según instrucciones del fabricante, y posterior análisis en citómetro de flujo (BD FACSCalibur).

5.14. Cuantificación de los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Se midieron los niveles intracelulares de H_2O_2 tiñendo las células con la sonda 2', 7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína, acetil éster (CMH₂DCFDA), que se difunde a través de las membranas y se oxida por el H_2O_2 a diclorofluoresceína (DCF), un fluorescente verde. Se sembraron 1×10^6 células que fueron incubadas con CMH₂DCFDA $5 \mu M$ a $37^\circ C$ en oscuridad, por un periodo de 30 min seguidos de dos lavados de 30 min con medio de cultivo fresco a $37^\circ C$. Las células se recogieron con tripsina y se resuspendieron en medio D-MEM sin suero y fueron analizadas a las longitudes de onda de excitación-emisión del fluorocromo, según instrucciones del fabricante, y posterior análisis en citómetro de flujo (BD FACSCalibur).

5.15. Determinación de la peroxidación lipídica.

Las células fueron cultivadas en cubreobjetos estériles de 22x22 mm, (Menzel-Gläser), en placas de 6 pocillos y se incubaron con el sensor de fluorescencia 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-ácido undecanoico (BODIPY 581/591 C11) a una concentración de 1 mM durante 30 minutos a $37^\circ C$, este reactivo es un análogo fluorescente de ácidos grasos con propiedades de fluorescencia en el rojo y rangos de color verde. La fluorescencia de esta sonda cambia de color rojo a verde por la oxidación inducida por los radicales libres. Las células se lavaron 3 veces con PBS, se examinaron por microscopía de fluorescencia y se midió la intensidad de fluorescencia utilizando el Software ImageJ.

5.16. Cuantificación de las vacuolas ácidas.

Se cuantificaron las vacuolas ácidas mediante la tinción con la sonda LysoTracker red DND-99(Molecular Probes), por microscopia de fluorescencia y citometría de flujo. Para ello se sembraron 1×10^6 células en placas de 6 pocillos y, tras alcanzar la suficiente confluencia, fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C con LysoTracker Red DND-99, fluoróforo que se concentran en las vacuolas ácidas, pasado el tiempo de incubación, el medio tratado se reemplazó por medio fresco y se incubaron las células 30 minutos más. A continuación las células se recogieron con tripsina y se resuspendieron en medio DMEM sin suero y fueron analizadas por citometría de flujo (citómetro de flujo BD FACSCalibur).

5.17. Determinación de Actividad β -galactosidasa ácida.

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos sobre cubres estériles hasta alcanzar la densidad óptima, momento en el cual se procede a su fijación. Para ello retiramos el medio y, tras lavar la monocapa celular con PBS dos veces, se fijan las células durante 5 minutos con 2% formaldehído/0,2% glutaraldehído en PBS. A continuación, se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con tampón de tinción (10mM Tampón fosfato pH 6,0, 150mM NaCl, 2mM $MgCl_2$, 40mM ácido cítrico, 5mM ferrocianuro potásico, 5mM ferricianuro potásico más 1mg/ml X-gal) a 37°C toda la noche, en ausencia de CO_2 . Finalizado el periodo de incubación, las células se lavaron con PBS y los cristales se montaron en portas en medio con glicerol. Las muestras se visualizaron con un microscopio invertido (Olympus IX71).

5.18. Determinación de la actividad enzimática de la β -Glucocerebrosidasa.

La medida de la actividad de GCasa se llevó a cabo en placas negras de 96 pocillos utilizando lisado de células empleando la 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido (MUGlu) como sustrato. Se incubaron 10 μ L de lisado a 37°C con 20 μ L de la solución de sustrato en tampón sodio-citrato (0.1 M, pH 5.2) suplementado con

taurocolato de sodio (0.8% w/v) durante 1 hora. La reacción se paró añadiendo 0.2 mL de tampón de hidróxido de sodio y glicina 0.2 M a pH 10.7. La liberación del derivado fluorogénico 4-metilumbeliferona se midió por fluorescencia usando Microplate Reader (excitación a 365 nm; emisión a 450 nm). La unidad de actividad enzimática se define como nmol de 4-metilumbeliferona por hora y normalizado para la cantidad de proteína total contenida en el lisado.

5.19. Determinación de expresión mRNA: PCR Tiempo Real

Los cultivos celulares con los distintos tratamientos después recogerlos con tripsina (0,25% Trypsin-EDTA Solution, Sigma), se centrifugaron a 800g durante 5 minutos. Al pellet resultante se añadió 1ml easy-BLUETM/10cm² de área de la placa de cultivo (easy-BLUETM, iNtRON Biotechnology). El cultivo con el reactivo de easy-BLUETM se dejó incubar durante 5 minutos a una temperatura de entre 15°C y 25°C para que se dissociaran los complejos de nucleoproteínas. A continuación se añadió Cloroformo (0,2ml/ml easy-BLUETM) y se agitó en vortex durante 15 segundos, para después dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 12000g y 4°C durante 15 min. Tras la centrifugación, la muestra quedó dividida en tres fases: una fase superior transparente (que contenía el RNA), una fase intermedia (que contenía el DNA) y una fase inferior de color verde-azul (en la que se encontraban las proteínas). La fase superior se transfirió a un nuevo eppendorf, en el cual se añadió Isopropanol (0,5ml/ml easy-BLUETM) y se mezcló por inversión. A continuación incubamos 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugamos a 12000g, 10 minutos a 4°C para retirar posteriormente el líquido sobrenadante, dejando un pellet de color blanco casi transparente. El RNA precipitado se lavó con EtOH 75% (1ml/ml easy-BLUETM) y se volvió a centrifugar a 7500g, 5 minutos a 4°C. A continuación se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado con EtOH 75% para mejorar los ratios de extracción. Tras el segundo lavado, se secó el pellet al vacío en la máquina Savant Speedvac para posteriormente resuspenderlo en 50µl de H₂O DEPC e incubarla 15 minutos a 60°C. El RNA ya purificado fue cuantificado mediante espectrofotometría

(Nanodrop ND-1000, de NanoDrop), teniendo en cuenta como eficiencia de la extracción los ratios 260/280 y 260/230, que deben encontrarse en torno a 2.0. El RNA extraído desde fibroblastos fue tratado con el kit Deoxiribonucleasa I, Amplification Grade (Sigma), como especifica su protocolo. Este tratamiento elimina la actividad RNAsa y los posibles restos de DNA para obtener un RNA útil para ensayos tan sensibles como la reacción en cadena de la polimerasa a Tiempo Real. A partir del RNA libre de RNAsa sintetizamos cDNA, usando el kit comercial iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad). La reacción de retrotranscripción se realiza según las condiciones indicadas por el fabricante. La reacción se llevó a cabo en un termociclador iCycler de BioRad, empleando 0,5 µg de RNA para cada reacción y siguiendo el siguiente protocolo: 5 minutos a 25°C; 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C. La PCR en tiempo real (RT-PCR) es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Es un tipo de PCR cuantitativa que mide la cantidad de cDNA o de mRNA en una muestra, y se utiliza comúnmente para determinar la expresión de un gen (número de copias de mRNA). El sistema de detección por fluorescencia que empleamos en nuestros ensayos para la determinación de la expresión génica por RT-PCR fue el sistema de detección por agentes intercalantes, concretamente SYBR Green. Para ello usamos el kit comercial SYBR Premix Ex Taq™ (Takara), siguiendo el protocolo descrito en el mismo y usando un volumen final de 25 µL con 2 µL de cDNA (obtenido a partir de 0,5 µg de RNA). La reacción fue llevada a cabo en un termociclador ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Para mejorar la especificidad de este fluorocromo iniciamos la reacción de síntesis de DNA a temperaturas elevadas (hot-start PCR), disminuyendo de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Además, empleamos condiciones de reacción óptimas así como una selección cuidadosa de los cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Para ello, los cebadores para RT-PCR fueron diseñados con el programa informático Primer Premier 5.0 (Biosoft Internacional). Los cebadores se usaron a una concentración de 700nM y las secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de BECLIN1 fueron; Cebador Sense:

5'GGATGGATGTGGAGAAAGGCAAG3';Antisense:5'TGAGGACACCCAAGCAAGAC C3',paraATG12;Sense:5'ATTGCTGCTGGAGGGGAAGG3',Antisense:5'GGTTCGTGT TCGCTCTACTGC3';MAPLC3;Sense:5'GCCTTCTTCCTGCTGGTGAAC3';Antisense:5 'AGCCGTCCTCGTCTTTCTCC3' y se utilizó como gen calibrador cebadores específicos para el gen de la Actina;Sense:5'TCCTACAATGAGCTGCGTGTG 3';Antisense:5'GGTGAGGATCTTCATGAGGT3'.

5.20. Tratamiento con Endoglicosidasa-H.

Los lisados celulares (70 µg total de proteína) se desnaturalizaron mediante el tampón (New England Biolabs 5% SDS, 0.4 M Ditioneitol) a 100°C durante 15 minutos. El lisado se incubó con la mezcla de reacción compuesta por la Endoglicosidasa-H y el tampón (New England Biolabs 0.5 M sodium citrate, pH 5.5) durante una hora a 37°C, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente se visualizaron los productos de la reacción mediante SDS-Page y Western-Blotting.

5.21. Síntesis de la chaperona farmacológica NAdBT-AIJ.

La síntesis de la chaperona farmacológica NAdBT-AIJ no ha sido objeto de esta tesis y fue cedida por la profesora Carmen Ortiz Mellet, catedrática del departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla y José Manuel García Fernández, Profesor de Investigación del instituto de Investigaciones Químicas-CSIC. La síntesis del compuesto se preparó en dos etapas, partiendo de D-glucufuranurono-6,3-lactona comercial vía la 5-azido-5-desoxi—1,2-O-isopropiliden- α -L-idoofuranosa. Mediante la reacción con un isotiocianato obtenemos un derivado de tipo tiourea [200].La hidrólisis del grupo 1,2-O-isopropilideno mediante el ácido trifluoroacético en agua (9:1) da lugar al sistema bicíclico de 6-oxanortropano y la transformación del grupo hidroxilo mediante la adición nucleofílica de 4-(1-adamantanil-carboxamida)isocianatobutilo [208],

obtenemos el compuesto N-[N'-(4-adamantan-ilcarboxamidobutil)tiocarbamoilo]-1,6-anhidro-L-idonójirimicina (NAdBT-AIJ).

5.22. Análisis estadístico.

Todos los resultados se expresan como la media aritmética \pm desviación estándar de la misma. Los datos se analizaron haciendo uso del programa estadístico SigmaStat 3. Los métodos estadísticos para evaluar la significación de diferencias ha sido el test de la t de Student y el análisis de la varianza (ANOVA) para el estudio entre más de dos grupos, aceptando un nivel de significación de $p < 0.05$ en todos los casos.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

TRATAMIENTO CON COENZIMA Q₁₀ EN MODELOS CELULARES DE LA ENFERMEDAD DE MERRF

Al igual que muchas enfermedades mitocondriales, no hay cura para el síndrome MERRF, y el tratamiento es principalmente sintomático. La coenzima CoQ se ha usado en la terapia de este síndrome con la esperanza de mejorar la función mitocondrial, aunque no hay una evidencia definitiva de la eficacia de este tratamiento.

Por ello evaluamos la efectividad terapéutica de la coenzima Q₁₀ sobre la disfunción mitocondrial primaria en el síndrome de MERRF en fibroblastos derivados de pacientes portadores de la mutación 8344A>G.

Para el estudio utilizamos fibroblastos dérmicos derivados de 3 pacientes portadores de la mutación (8344A>G): MERRF-1 con una heteroplasmia de un 57%, MERRF-2 con una heteroplasmia de un 35% y MERRF-3 con una heteroplasmia del 8%. La caracterización de estas líneas células nos suministró una gran cantidad de información para comprender las alteraciones fisiopatológicas presentes en esta enfermedad. Por otra parte, las líneas celulares de cíbridos transmitocondriales son una de las herramientas esenciales en la investigación mitocondrial [209]. Los cíbridos transmitocondriales son diseñados para que las mitocondrias que residen en una célula se incorporen permanentemente al citoplasma de otra célula a la que previamente se ha desprovisto de DNA mitocondrial y que por tanto no tienen mitocondrias funcionales [210]. De esta forma las alteraciones fisiopatológicas detectadas en los cíbridos se deberán a las mitocondrias disfuncionales independientemente del contexto nuclear. Ambos modelos, fibroblastos y cíbridos, resultan pues muy eficaces para conocer los mecanismos moleculares de la enfermedad mitocondrial y el uso de diferentes tratamientos que supriman o mejoren las alteraciones fisiopatológicas detectadas. De esta forma utilizamos los cíbridos portadores de la mutación 8344A>G para confirmar la existencia de las alteraciones encontradas en los fibroblastos de los pacientes y el efecto beneficioso de la coenzima Q₁₀ sobre estas células.

6.1 Efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ sobre la disfunción mitocondrial primaria en fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF

En primer lugar determinamos la concentración óptima de CoQ, mediante un ensayo de la proliferación celular ya que las alteraciones mitocondriales afectan al nivel energético celular y promueven la acumulación de metabolitos tóxicos que repercuten directa y negativamente en el correcto crecimiento y proliferación celular [211]. Posteriormente se procedió a tratar a los fibroblastos y cíbridos con CoQ (100μM) durante 72 horas para determinar su actuación sobre las alteraciones fisiopatológicas. En los cultivos de fibroblastos control y fibroblastos MERRF evaluamos el efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ (CoQ) sobre la disfunción mitocondrial. Para ello, medimos los niveles de CoQ, la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria, los niveles intracelulares de ATP, la proliferación celular, el $\Delta\Psi_m$ y la producción de ROS.

En primer lugar, determinamos si los fibroblastos MERRF tenían deficiencia de CoQ. Los fibroblastos MERRF mostraron una disminución de un 46% en los niveles de CoQ comparados con los fibroblastos control (Figura 19a). La deficiencia en CoQ en los fibroblastos MERRF estaba asociada a una reducción significativa de un 46% en la actividad enzimática de los complejos (I+III) de la cadena respiratoria mitocondrial. Los datos de actividad enzimática de los complejos (I+III) se expresaron en unidades por Citrato Sintasa (U/CS) para normalizarlo al contenido mitocondrial. La actividad enzimática de los complejos (I+III) en los fibroblastos MERRF tratados con CoQ se incrementó a valores cercanos al control (Figura 19b). Para determinar si la disfunción mitocondrial observada tenía un efecto sobre la bioenergética celular, medimos los niveles intracelulares de ATP en los fibroblastos control y fibroblastos MERRF. Los fibroblastos MERRF presentaron menores niveles de ATP, con una disminución porcentual del 50% respecto a los fibroblastos control. El tratamiento con CoQ resultó en un aumento significativo en los niveles celulares de ATP en los fibroblastos MERRF, pero no tuvo ningún efecto sobre los fibroblastos control (Figura 19c).

Las alteraciones mitocondriales afectan negativamente a la bioenergética celular y al correcto crecimiento de las células. A continuación determinamos el efecto de la mutación 8344A>G en la proliferación celular. Los fibroblastos MERRF mostraron una disminución en la tasa de proliferación celular comparada con los fibroblastos control. A su vez, la tasa de proliferación celular se incrementó a valores casi normales tras el tratamiento de CoQ (Figura 19d)-

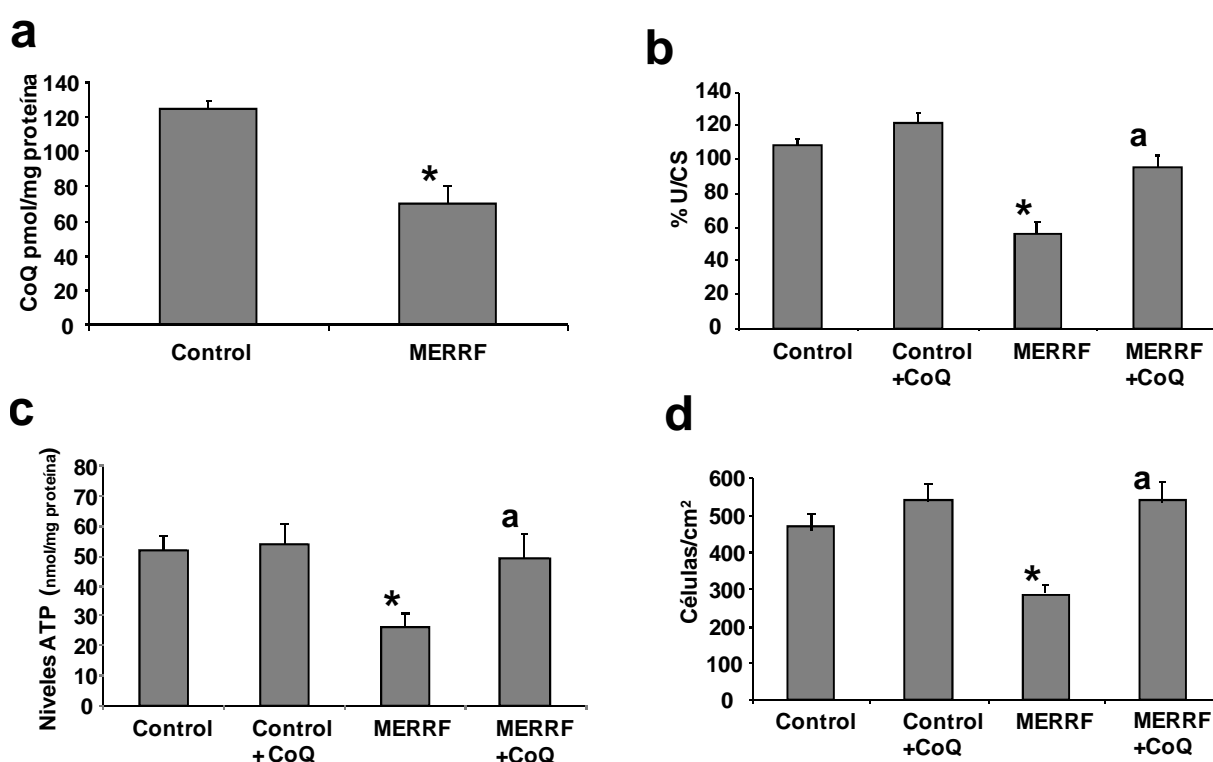


Figura 19 . **Disfunción mitocondrial en fibroblastos de pacientes con el síndrome MERRF.** **(a)** Contenido de CoQ₁₀ en 3 líneas de fibroblastos derivados de pacientes MERRF (MERRF-1, MERRF-2 y MERRF-3) y 2 líneas de fibroblastos control. Los niveles de CoQ₁₀ fueron analizados por HPLC siguiendo el protocolo descrito en el apartado Materiales y Métodos. **(b)** Actividad enzimática de los complejos NADH-Citocromo c-Reductasa (I+III) medido en las células cultivadas en presencia o ausencia de CoQ (100 μM) durante 72 h. La determinación de la actividad enzimática de los complejos I+III, se llevó a cabo por análisis espectrofotométrico según descrito en el apartado Materiales y Métodos. Los resultados se expresan en U/CS (unidades por citrato sintasa). **(c)** Cuantificación de los niveles de adenosín-5'-trifosfato (ATP) mediante el uso de un luminómetro, utilizamos un kit de determinación de ATP y siguiendo el protocolo descrito en el apartado de Material y Métodos. Representación gráfica representa de los niveles de ATP alcanzados por los fibroblastos MERRF tras el tratamiento con CoQ transcurridas 72 horas a una concentración de 100 μM. **(d)** Cuantificación de la tasa de proliferación celular de fibroblastos con y sin tratamiento con CoQ. Se utilizó un microscopio invertido con objetivo 40X (Olympus IX71) el conteo celular fue realizado en cuatro campos distintos elegidos al azar y siguiendo el protocolo descrito en el apartado Material y Métodos. Representación gráfica de la proliferación celular alcanzada por los fibroblastos MERRF tras el tratamiento con CoQ transcurridas 72 horas a una concentración de 100 μM. Los resultados se expresan en número de células/cm². Los datos mostrados representan la media ±DS de 3 experimentos independientes. *p<0,01 entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. ^ap<0,05 entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ.

6.1.1 Efecto del tratamiento con coenzima Q_{10} sobre el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

Para evaluar las consecuencias funcionales de la reducción de la actividad de las enzimas de la CRM y los niveles de CoQ en los fibroblastos patológicos, determinamos el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en los fibroblastos de los pacientes MERRF y los fibroblastos control, utilizando la sonda fluorescente MitoTracker Red CMXRos, un colorante selectivo de mitocondrias funcionalmente activas, que es captado dependiendo del $\Delta\Psi_m$. Los análisis de las imágenes de microscopía de fluorescencia mostraron una red mitocondrial con mitocondrias tubulares con alto potencial mitocondrial en los fibroblastos control mientras que los fibroblastos MERRF mostraron una red mitocondrial alterada con mitocondrias de forma redondeada y con menor $\Delta\Psi_m$ (Figura 20a).

Para confirmar los cambios observados en el $\Delta\Psi_m$, marcamos el citocromo c, una proteína mitocondrial, con un anticuerpo unido a un fluoróforo que emite en verde en microscopía de fluorescencia. La señal del MitoTracker colocalizó con la señal del citocromo c, confirmando la especificidad de la tinción de la sonda MitoTracker y verificando que la despolarización mitocondrial en los fibroblastos MERRF no era el resultado de la liberación de Citocromo c, como ocurre en la apoptosis [212]. El tratamiento con CoQ (100 μ M) restauró la morfología de la red mitocondrial y provocó un aumento de la absorción de la sonda MitoTracker en los fibroblastos MERRF, lo que indica la restauración del $\Delta\Psi_m$ (Figura 20a y 20b).

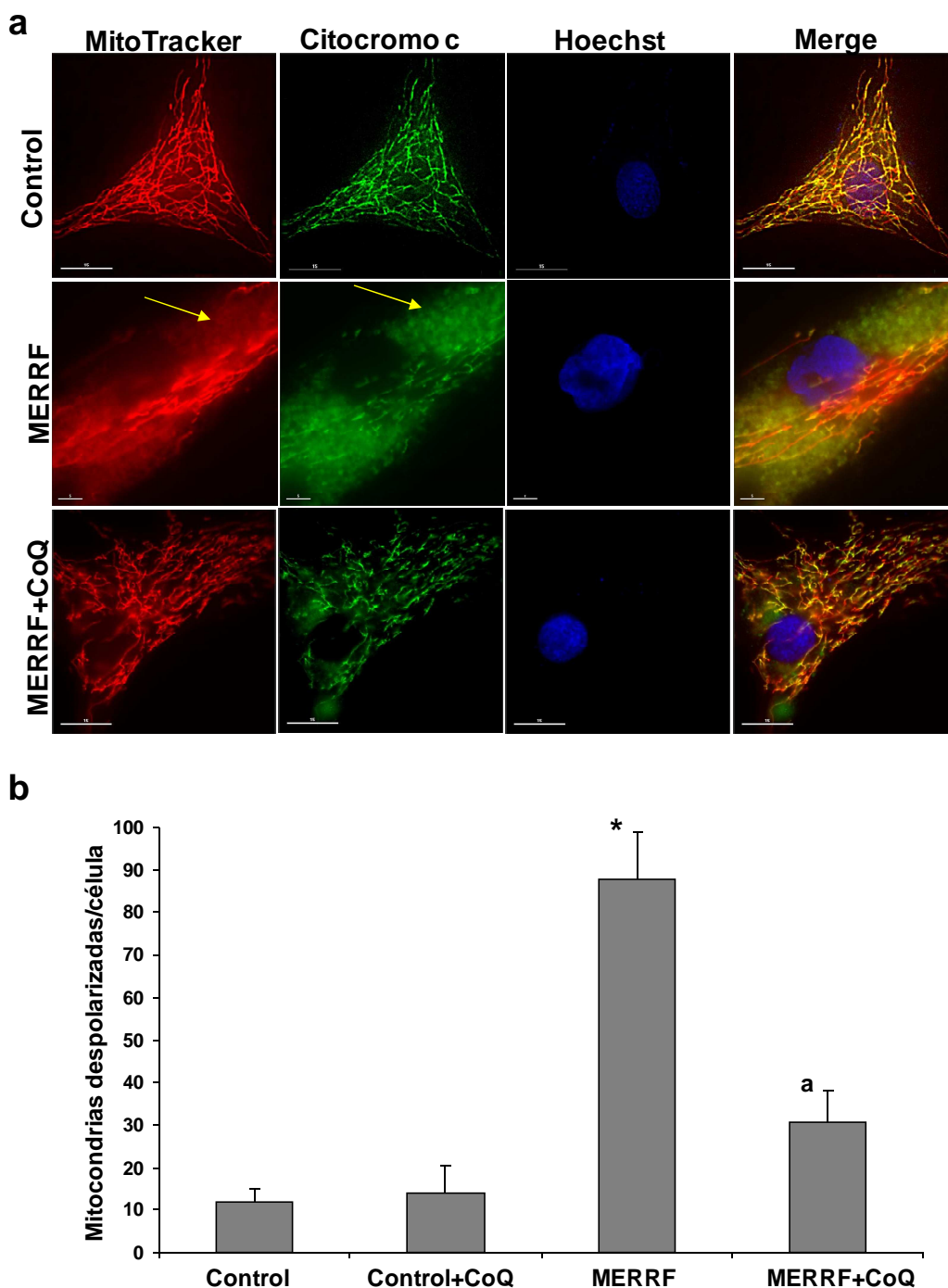


Figura 20 . **Potencial de membrana mitocondrial en fibroblastos de pacientes con el síndrome MERRF.** (a) Análisis de imágenes por microscopía de fluorescencia del $\Delta\Psi_m$ mediante la utilización de la sonda MitoTracker Red CMXRos y Citocromo c, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Imágenes representativas de los fibroblastos control y de los fibroblastos MERRF sin tratar y tratados con CoQ a una concentración de 100 μ M durante 72 horas. Las flechas amarillas indican las mitocondrias pequeñas y despolarizadas. (b) Cuantificación de las mitocondrias fragmentadas y despolarizadas. Representación gráfica de la cuantificación de las mitocondrias pequeñas y despolarizadas siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. La cuantificación de mitocondrias despolarizadas fue realizada mediante un análisis de imágenes de fluorescencia en 50 células tomadas al azar del cultivo de fibroblastos control y fibroblastos MERRF. La especificidad mitocondrial de la tinción de las mitocondrias por MitoTracker se evaluó mediante el examen de colocalización de fluorescencia entre la sonda MitoTracker con el Citocromo c. Escala de la barra=15 μ m. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes.*p<0,01 entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. ^ap<0,05 entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ.

6.1.2 Efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales.

Para comprobar que la deficiencia de CoQ y la disfunción mitocondrial en los fibroblastos MERRF estaban asociadas a un aumento en la producción de ROS mitocondriales, se examinó la generación del anión superóxido mitocondrial (O₂⁻) en los fibroblastos control y fibroblastos MERRF, utilizando la sonda MitoSOX™ un indicador fluorescente específico de los niveles de O₂⁻ mitocondriales. También se determinó la masa mitocondrial utilizando la sonda fluorescente 10-N-nonil naranja de acridina (NAO) que se une específicamente a la cardiolipina presente en la membrana interna mitocondrial, independientemente del $\Delta\Psi_m$ [213]. De esta forma pudimos marcar de manera específica las mitocondrias y así poder referir las medidas de ROS a la masa mitocondrial. Los niveles de O₂⁻ y masa fueron determinados por citometría de flujo. Además, determinamos la ratio de la señal de fluorescencia de la sonda MitoSOX™ y la señal de fluorescencia de NAO. Los resultados obtenidos muestran un aumento en la producción de ROS mitocondriales en los fibroblastos de pacientes MERRF de 2,5 veces comparados con los control. El tratamiento de los cultivos celulares con CoQ fue suficiente para reducir los niveles de ROS mitocondriales en los fibroblastos MERRF, sin tener ningún efecto en los cultivos de fibroblastos control (Figura 21).

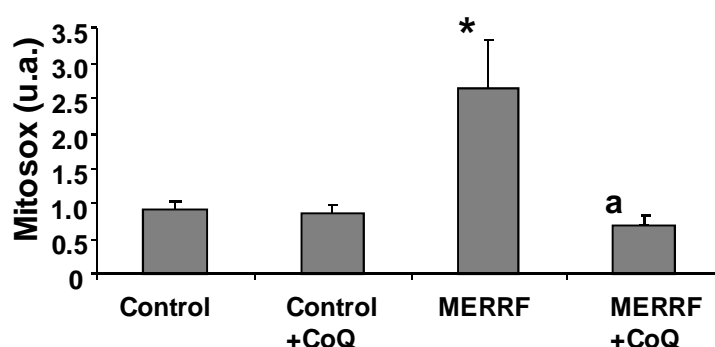


Figura 21. **Producción de ROS mitocondriales en fibroblastos de pacientes con el síndrome MERRF.** Niveles de ROS mitocondriales utilizando el marcador MitoSOX, en fibroblastos control y fibroblastos MERRF portadores de la mutación 8344A>G, sin tratar y tratados con CoQ a una concentración de 100 μ M durante un periodo de 72 horas. Los resultados se expresan como la ratio de señal de MitoSOX/10-N-nonil naranja de acridina (NAO). Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes.* $p < 0,01$ entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. ^a $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ.

6.1.3 Efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ sobre la peroxidación lipídica en fibroblastos de pacientes MERRF.

En los fibroblastos de pacientes MERRF, la disfunción de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y la fosforilación oxidativa, está asociado con un aumento en la formación de ROS.

Dado que la producción exagerada de ROS por las mitocondrias provoca estrés oxidativo en las membranas mitocondriales y celulares, cuantificamos los niveles de peroxidación lipídica utilizando el sensor fluorescente BODIPY (581/591)C11 el cual emite una señal de color naranja en su estado reducido y verde en su estado oxidado (Figura 22b). Los resultados obtenidos mostraron un incremento en la ratio de la señal de fluorescencia de lípidos oxidados/lípidos reducidos en los fibroblastos MERRF comparados con los fibroblastos control, lo que nos sugiere un mayor daño en las membranas celulares por estrés oxidativo. El aumento en la peroxidación lipídica fue parcialmente impedido por el tratamiento con CoQ (Figura 22a).

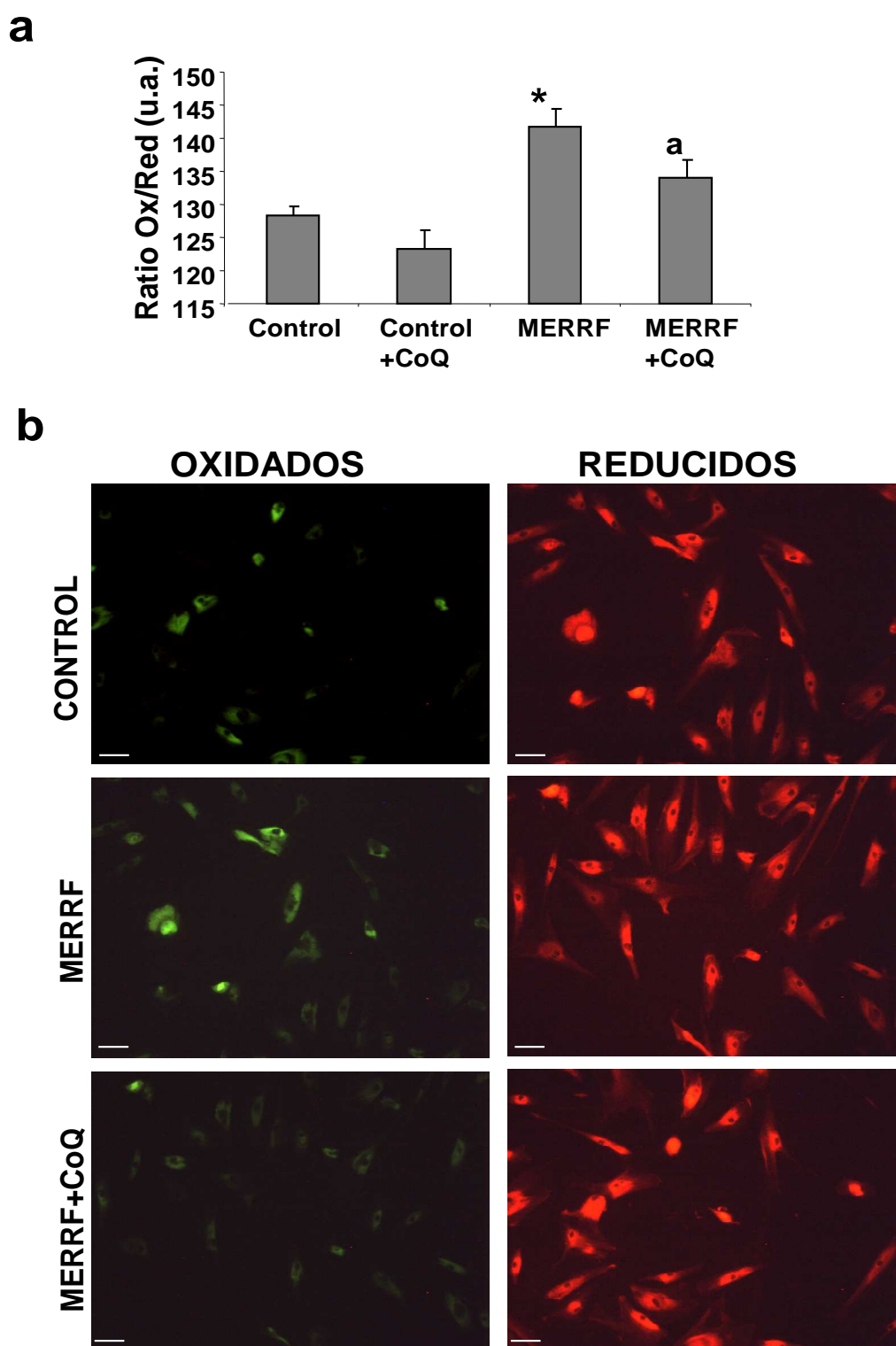


Figura 22. **Peroxidación lipídica en fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF.** (a) Cuantificación de los niveles de peroxidación lipídica en los fibroblastos control y fibroblastos MERRF en presencia o ausencia de la CoQ (100 μ M) durante 72 h. Los datos representan la ratio de la señal de fluorescencia de lípidos oxidados/ lípidos reducidos. Mediante la tinción con BODIPY(581/591)C11.(b) Imágenes de los cultivos celulares. La Fluorescencia anaranjada representa los lípidos no oxidado y la fluorescencia verde representa los lípidos oxidados. Escala barra=30micras.u.a.(unidades arbitrarias). Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes.* $p < 0,01$ entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. ^a $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ.

6.2 Autofagia en los fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF.

El incremento de las ROS se ha relacionado recientemente con la activación de la autofagia [214]. Para comprobar que la activación de la autofagia en los fibroblastos MERRF estaba asociada a un aumento en la producción de ROS mitocondriales, analizamos la expresión, tanto a nivel de mRNA como a nivel proteico, de distintos marcadores que participan en la autofagia. En primer lugar, analizamos la expresión génica de ATG12, BECLIN1 y LC3 que codifican proteínas implicadas en la autofagia. La expresión de estos tres genes mostraron un incremento significativo en los fibroblastos MERRF, con un aumento de 13 veces en ATG12, un aumento de 14 veces en BECLIN1, y un aumento de 22 veces en la expresión de LC3 comparadas con los fibroblastos control. El tratamiento con CoQ disminuyó la expresión génica de estos tres genes en los fibroblastos MERRF sin tener ningún efecto en los fibroblastos control (Figura 23a). Por otro lado, examinamos la expresión proteica de los mismos marcadores autofágicos mediante Western-Blotting. Los resultados mostraron un incremento del procesamiento de LC3 I (forma citosólica) a LC3 II (forma unida al autofagosoma), indicándonos un aumento en la formación/acumulación de autofagosomas en los fibroblastos MERRF.

Otras proteínas necesarias para las etapas iniciales de la formación del autofagosoma son el sistema de conjugación ATG12-ATG5. El complejo formado por las proteínas ATG12-ATG5 presentó mayores niveles de expresión en los fibroblastos MERRF comparados con los fibroblastos Control. Igualmente, los niveles de expresión de BECLIN1, otra proteína iniciadora en la formación del autofagosoma, mostró un aumento en los fibroblastos MERRF comparada con los fibroblastos control. La expresión de la proteína actina fue utilizada como control de carga en estos ensayos y fue similar en fibroblastos MERRF y control. El tratamiento de los cultivos celulares con CoQ, redujo parcialmente los niveles de expresión de las proteínas autofágicas (Figura 23b). El análisis densitométrico de las proteínas autofágicas se muestra en la Figura 23c.

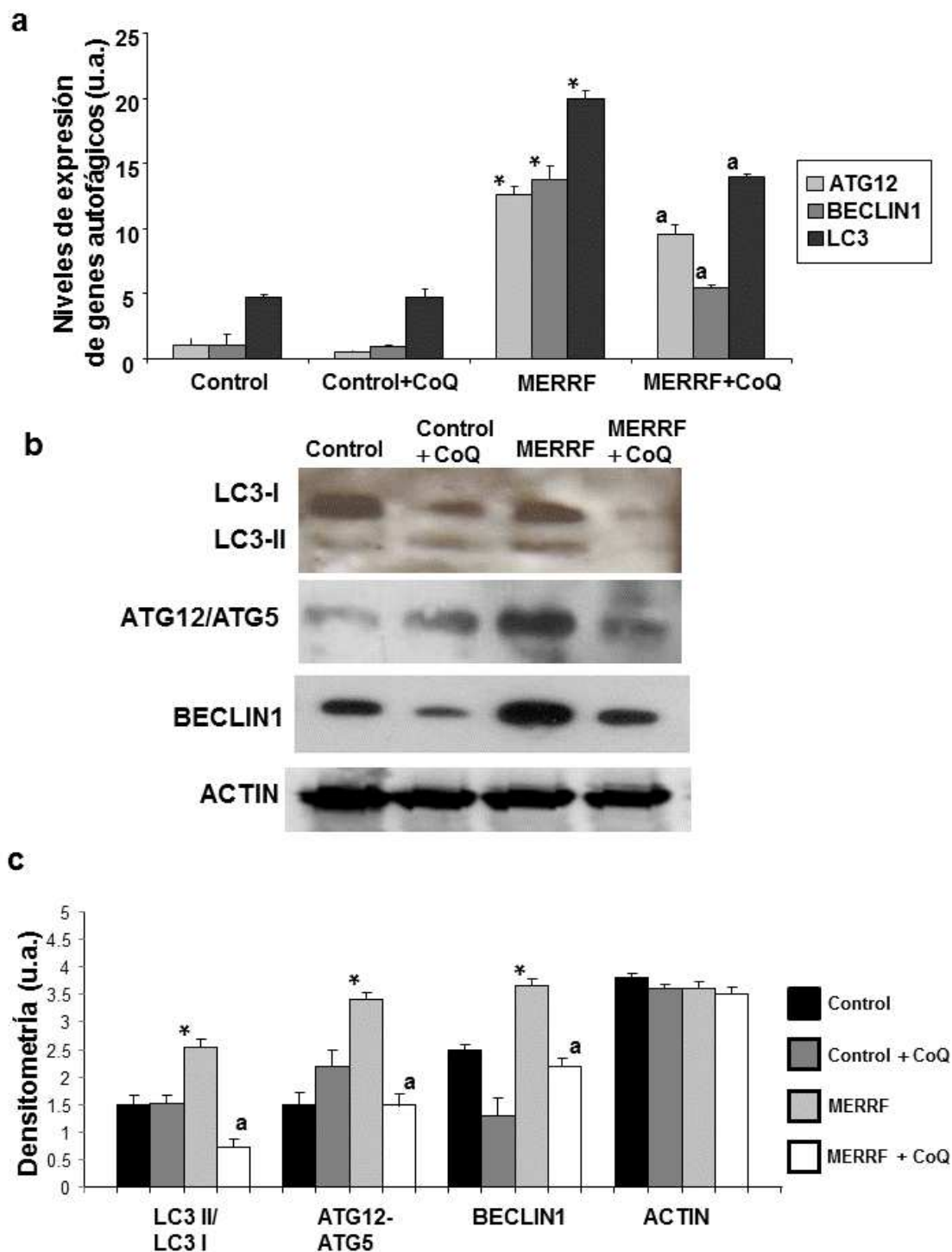


Figura 23. Estudio de la expresión de marcadores autofágicos a nivel de mRNA y proteínas en fibroblastos de pacientes con el síndrome MERRF. **(a)** La expresión génica a nivel de mRNA de ATG12, BECLIN 1 y LC3 en fibroblastos control y de pacientes MERRF fueron medidos por Real Time PCR como se describe en Material y Métodos. El tratamiento con CoQ disminuyó la expresión génica de estos tres genes en los fibroblastos MERRF. **(b)** Niveles de expresión en las distintas proteínas autofágicas de los mismos fibroblastos mediante ensayos Western-Blotting. La proteína ATG12, que forma complejo con ATG5, aparece con niveles aumentados en los fibroblastos derivados de paciente MERRF comparado con los fibroblastos Control. BECLIN 1, sufre similar incremento. Por otro lado, la forma activa de LC3 (LC3-II), se encuentra en mayor expresión en los fibroblastos patológicos comparada a la expresión encontrada en fibroblastos control. El tratamiento con CoQ a 100 μ M durante 72 horas fue capaz de revertir estos niveles proteicos. **(c)** Densitometría de la expresión de proteínas autofágicas realizadas por Western-Blotting mediante el software ImageJ. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes.* $p < 0,01$ entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. * $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ.

6.2.1 Efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ sobre la actividad β -Galactosidasa ácida lisosomal.

A fin de confirmar la activación del proceso autofágico en los fibroblastos de los pacientes MERRF, analizamos la expresión de indicadores lisosomales como la β -galactosidasa ácida, la Catepsina D, y cuantificamos las vacuolas ácidas. En primer lugar, para comprobar el aumento de la actividad lisosomal, cuantificamos mediante microscopía la actividad de la enzima lisosomal β -galactosidasa ácida (Figura 24a). Efectivamente, la cantidad de β -galactosidasa fue aproximadamente dos veces mayor en cultivos de fibroblastos MERRF comparadas con los controles. El tratamiento con CoQ redujo el nivel de β -galactosidasa en cultivos de fibroblastos MERRF pero no tuvo ningún efecto sobre la cantidad de la β -galactosidasa en los fibroblastos control (Figura 24b).

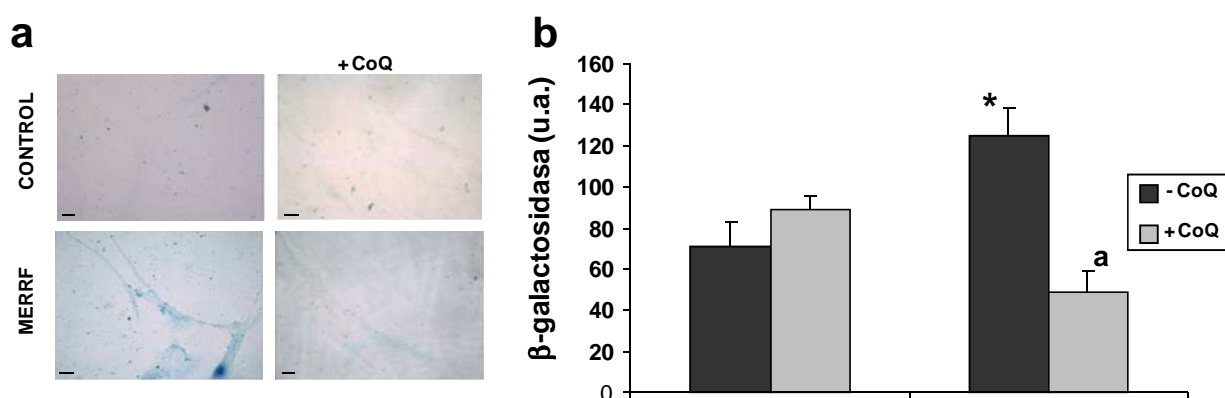


Figura 24. **β -galactosidasa ácida lisosomal en fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF** (a) Análisis de la actividad lisosomal mediante la técnica β -galactosidasa ácida, colorante específico lisosomal, como se recoge en Materiales y Métodos. Imágenes representativas tomadas por microscopía óptica mediante campo claro de fibroblastos de pacientes MERRF y fibroblastos control. Se analizó el efecto del tratamiento con CoQ en los cultivo celulares. (b) Cuantificación de la tinción de la β -galactosidasa en fibroblastos de pacientes MERRF y fibroblastos control mediante el software ImageJ. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes.* $p < 0,01$ entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. ^a $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ.

6.2.2 Efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ sobre la degradación mitocondrial por autofagia.

A su vez, confirmamos la activación de la autofagia en fibroblastos de pacientes MERRF, cuantificando el número de vacuolas ácidas utilizando la sonda LysoTracker red DND-99, un colorante selectivo de orgánulos ácidos por microscopia de fluorescencia y citometría de flujo (Figuras 25a y 25c).

Por un lado, comprobamos la presencia de la degradación de mitocondrias por autofagia mediante la visualización por microscopía de fluorescencia de la proteína mitocondrial citocromo c por medio de un anticuerpo unido a un fluoróforo que emite en verde y la tinción de las vacuolas ácidas con la sonda LysoTracker red DND-99. La microscopía de fluorescencia mostró gran cantidad de vacuolas ácidas en los fibroblastos MERRF, lo que indica una mayor captación de la sonda LysoTracker red DND-99 (Figura 25a). En una ampliación de las imágenes de fluorescencia, la flecha roja indica las mitocondrias tubulares en verde marcadas con Citocromo c, donde no existe colocalización ($r=0.0826$) con la tinción de LysoTracker en rojo. La flecha amarilla indica los puntos de colocalización ($r=0.9555$) entre el marcador mitocondrial Citocromo c, de las mitocondrias aisladas y pequeñas con la tinción de la sonda LysoTracker red DND-99, mostrando la degradación de mitocondrias en autofagolisosomas en los fibroblastos MERRF (Figura 25b). El tratamiento con CoQ redujo los puntos de colocalización Citocromo c/LysoTracker red DND-99, en los fibroblastos MERRF (Figura 25a). La cuantificación de las vacuolas ácidas mediante citometría de flujo con LysoTracker red DND-99 en los fibroblastos MERRF fue el doble comparadas con los controles, A su vez, el tratamiento con CoQ produjo una reducción en la intensidad de la tinción con LysoTracker en los fibroblastos MERRF, hasta alcanzar niveles similares a los valores a los controles, sin tener ningún efecto en los cultivos de fibroblastos de pacientes libres de la enfermedad (Figura 25c).

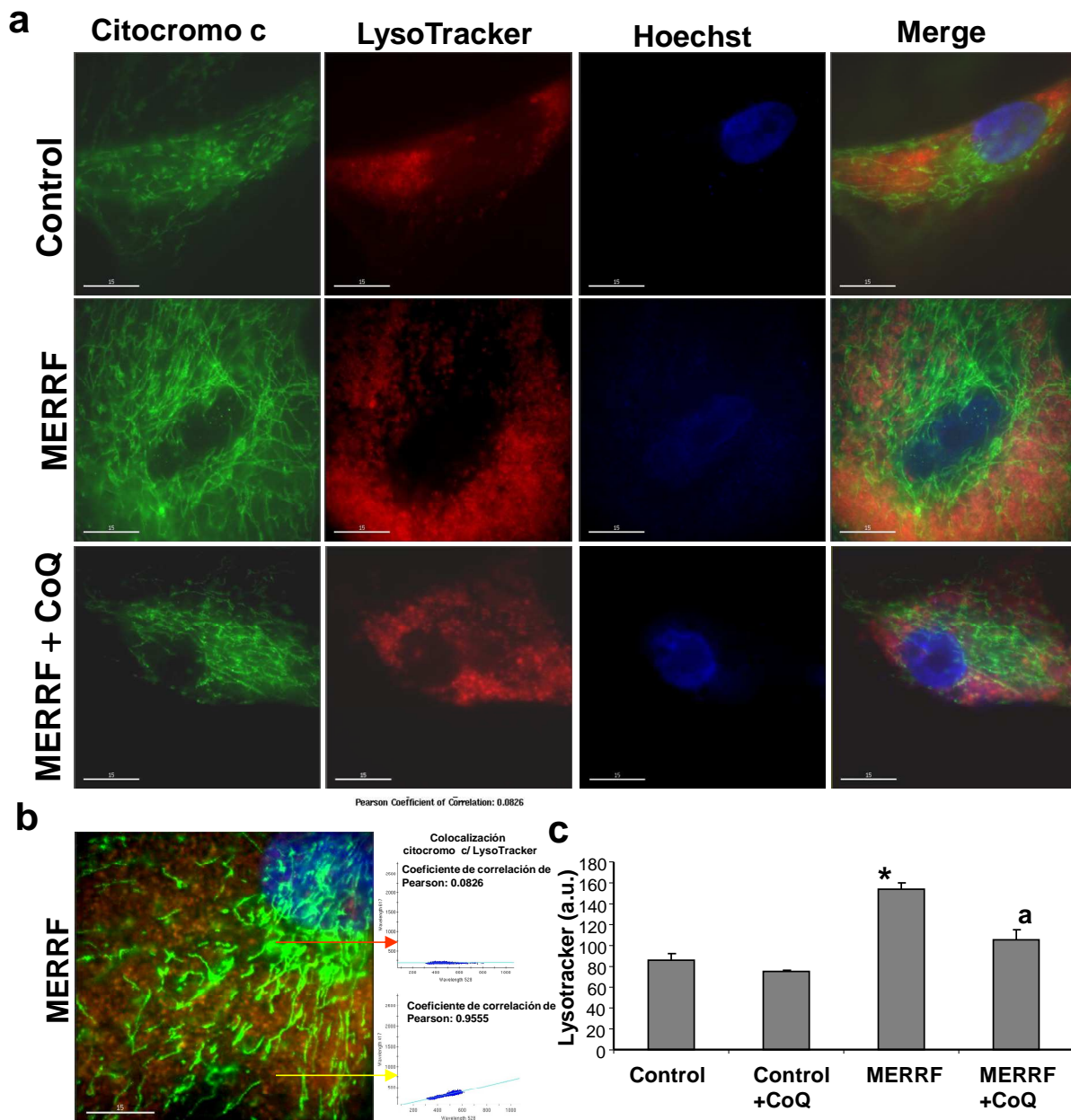


Figura 25. Degradación mitocondrial en fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF. **(a)** Análisis de imágenes de fluorescencia y cuantificación de vacuolas ácidas mediante la tinción con LysoTracker red DND-99. Se analizó el efecto del tratamiento con CoQ (100 μ M) durante 72 horas en los cultivos celulares por microscopía de fluorescencia. Escala de la barra=15 μ m. **(b)** Ampliación de un área de cultivos de fibroblastos MERRF de la tinción del marcador mitocondrial Citocromo c y LysoTracker, Las flecha amarilla muestran los autofagolisosomas, puntos de colocalización entre ambos marcadores. Realizado mediante el software DeltaVision system (Applied Precision; Issaquah,) que permite calcular el coeficiente de correlación de Pearson. Escala de la barra=15 μ m. **(c)** Cuantificación de vacuolas ácidas mediante citometría de flujo con la tinción con LysoTracker red DND-99, en fibroblastos control y fibroblastos MERRF portadores de la mutación 8344A>G, sin tratar y tratados con CoQ a una concentración de 100 μ M. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (u.a.). Para los fibroblastos control, los datos representan la media \pm DS de 2 líneas diferentes de fibroblastos control. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,01$ entre fibroblastos control y fibroblastos MERRF. ^a $p < 0,01$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ.

Para confirmar el aumento de la actividad lisosomal como consecuencia de una activación autofágica en el síndrome MERRF. En primer lugar, realizamos un análisis mediante microscopía de fluorescencia de la enzima lisosomal Catepsina D, una enzima que desarrolla su actividad proteolítica en el interior de los lisosomas, y que está presente mayoritariamente en este orgánulo, lo que la convierte en un buen marcador lisosomal. Realizamos una cuantificación del número de células positivas con Catepsina D que fue ocho veces mayor en los fibroblastos del paciente MERRF que en los fibroblastos control. El tratamiento de los cultivos celulares con CoQ provocó una ligera disminución de células positivas con Catepsina D en los fibroblastos control y fue suficiente para reducir a la mitad los niveles de células positivas con Catepsina D en los fibroblastos MERRF (Figura 26a). El aumento cantidad de Catepsina D en los fibroblastos MERRF y su disminución por el tratamiento con CoQ fue confirmada por Western Blotting (Figura 26b).

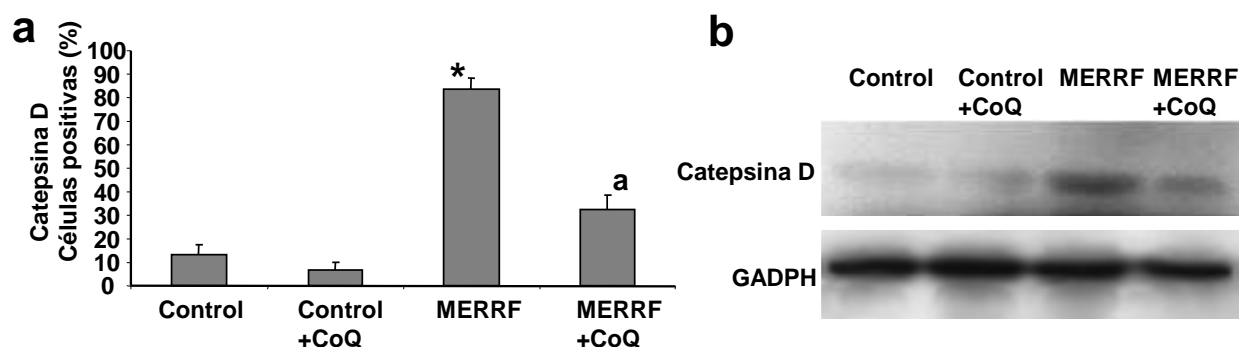


Figura 26. **Expresión de marcadores lisosomales en fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF.** (a) Cuantificación de las células positivas Catepsina D mediante microscopía de fluorescencia. (b) Expresión de los niveles de la enzima lisosomal Catepsina D por Western blotting como se describe en el apartado Material y Métodos. Tras el tratamiento con CoQ a 100 μ M durante 72 horas. La expresión de la enzima glucolítica GADPH (Gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa) fue usada como control de carga. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,01$ entre fibroblastos control y Fibroblastos MERRF. ^a $p < 0,01$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ.

Para verificar la degradación selectiva de mitocondrias (mitofagia) en los cultivos celulares de fibroblastos derivados de pacientes MERRF, se realizó ensayos de inmunofluorescencia con el Citocromo c, una proteína que está asociada con la membrana interna de la mitocondria y como marcador de autofagosomas se usó la proteína LC3. La tinción con LC3 era apenas detectable en los fibroblastos control, mientras que en los cultivos de fibroblastos MERRF, aparecían junto a las mitocondrias de forma alargada y tubular que eran negativas para LC3, mostraban una gran cantidad pequeñas mitocondrias individuales y fragmentadas que eran positivas para LC3 (Figura 27a). En una mayor ampliación de una imagen de un fibroblasto MERRF, la doble inmunotinción con los marcadores mostró colocalización entre el marcador mitocondrial Citocromo c y el marcador de autofagosomas, la proteína LC3. La flecha roja indica las mitocondrias alargadas donde no existe colocalización (colocalización $r=0.0121$) y eran negativas para LC3 y la flecha amarilla indica puntos de colocalización (colocalización $r=0.8687$) entre ambos marcadores Citocromo c/LC3, mostrando la degradación de mitocondrias, lo que hace evidente procesos mitofágicos en los fibroblastos derivados de pacientes MERRF (Figura 27b). Se cuantificó los puntos discretos de colocalización (“punctata”) LC3/Citocromo c, en los fibroblastos control y fibroblastos MERRF y el tratamiento con CoQ redujo los niveles de la proteína LC3 y los puntos de colocalización LC3/Citocromo c, en los fibroblastos de pacientes MERRF. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran que el tratamiento con CoQ disminuye drásticamente la mitofagia presente en los fibroblastos MERRF (Figura 27a) y reduce el número de puntos discretos “punctata” donde colocan el marcador mitocondrial Citocromo c y el marcador autofágico LC3 (Figura 27c).

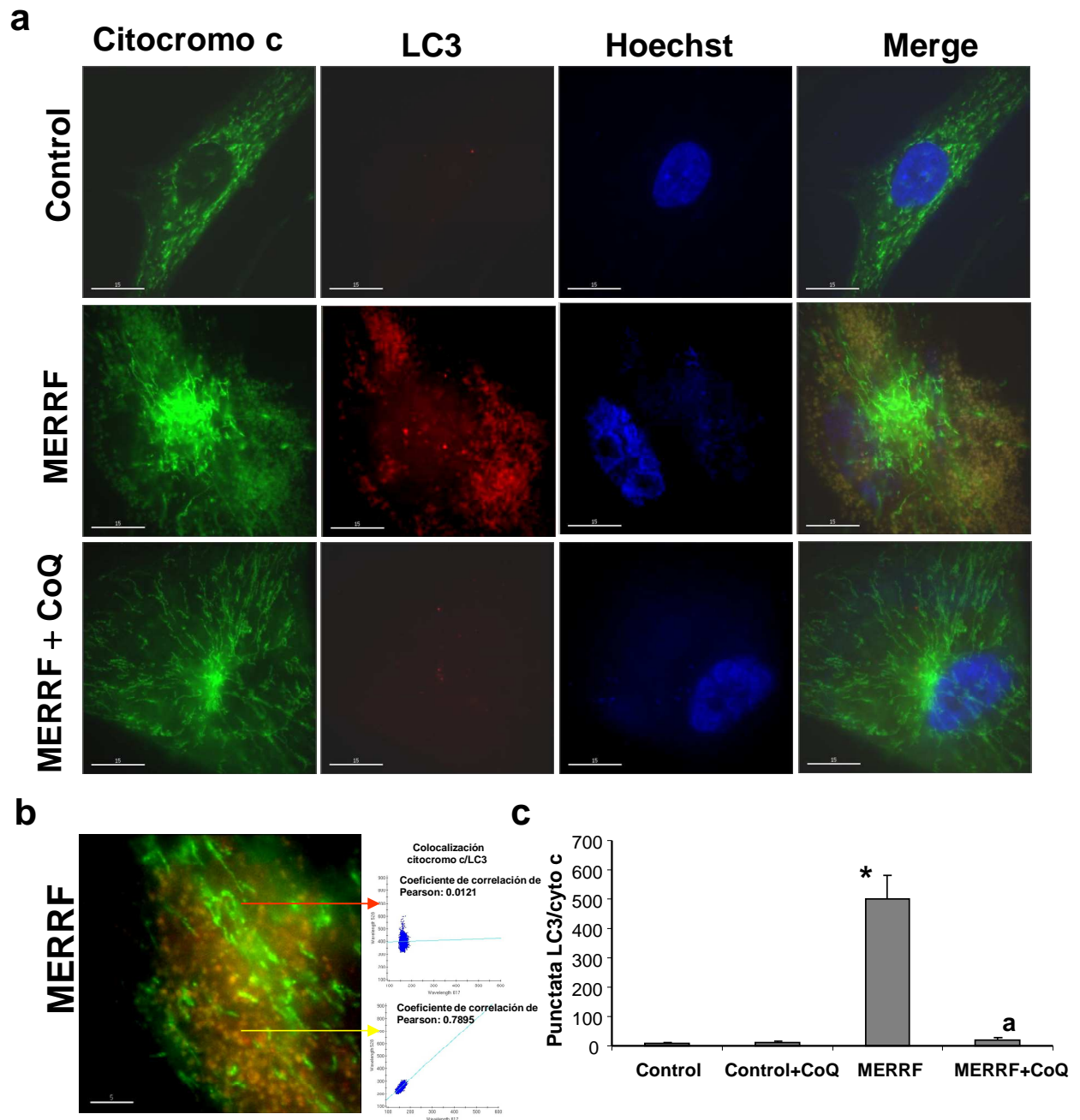


Figura 27. **Degradación mitocondrial y autofagosomas en fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF.** (a) Imágenes de fluorescencia mediante el uso de LC3 como marcador de autofagosomas y Citocromo c como marcador mitocondrial de los fibroblastos control y de los fibroblastos MERRF tras el tratamiento con Coenzima Q₁₀ (100μM CoQ). (b) Ampliación de un área de la imagen de un fibroblasto MERRF, las flechas indican los puntos de colocalización “punctata” entre ambos marcadores. (c) Cuantificación de puntos de colocalización LC3/Citocromo c en los fibroblastos derivados de pacientes MERRF. Los datos mostrados representan la media ± DS de 3 experimentos independientes. * p <0,01 entre fibroblastos control y Fibroblastos MERRF. ^ap<0,01 entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ.

6.2.3 Confirmación de la selectividad autofágica de mitocondrias disfuncionales por mitofagia.

Para llevar a cabo esta confirmación de la activación de la mitofagia en fibroblastos derivados de pacientes MERRF, realizamos ensayos por Western Blotting donde analizamos el estado de diferentes compartimentos celulares mediante la observación de niveles de expresión de proteínas específicas de dichos orgánulos. Las proteínas marcadoras elegidas fueron para los niveles de expresión mitocondrial fueron, Porina, Complejo I (subunidad 30 kDa), Complejo II (subunidad 30 kDa), Complejo III (subunidad core 1), Complejo IV (subunidad COX II), los cuales estaban disminuidos significativamente comparados con los fibroblastos control y como marcadores para los distintos orgánulos celulares fueron, Peroxisomas (catalasa), Aparato de Golgi (Golgi Marker), Retículo endoplasmático (PDI), los niveles de expresión de estas proteínas no se vieron afectados comparados con los fibroblastos control. Como control de carga se utilizó GADPH y Actina.

El tratamiento con CoQ aumentó los niveles de expresión de las proteínas mitocondriales, sin producir ningún efecto en los demás marcadores para los distintos orgánulos celulares (Figura 28a y 28b) .

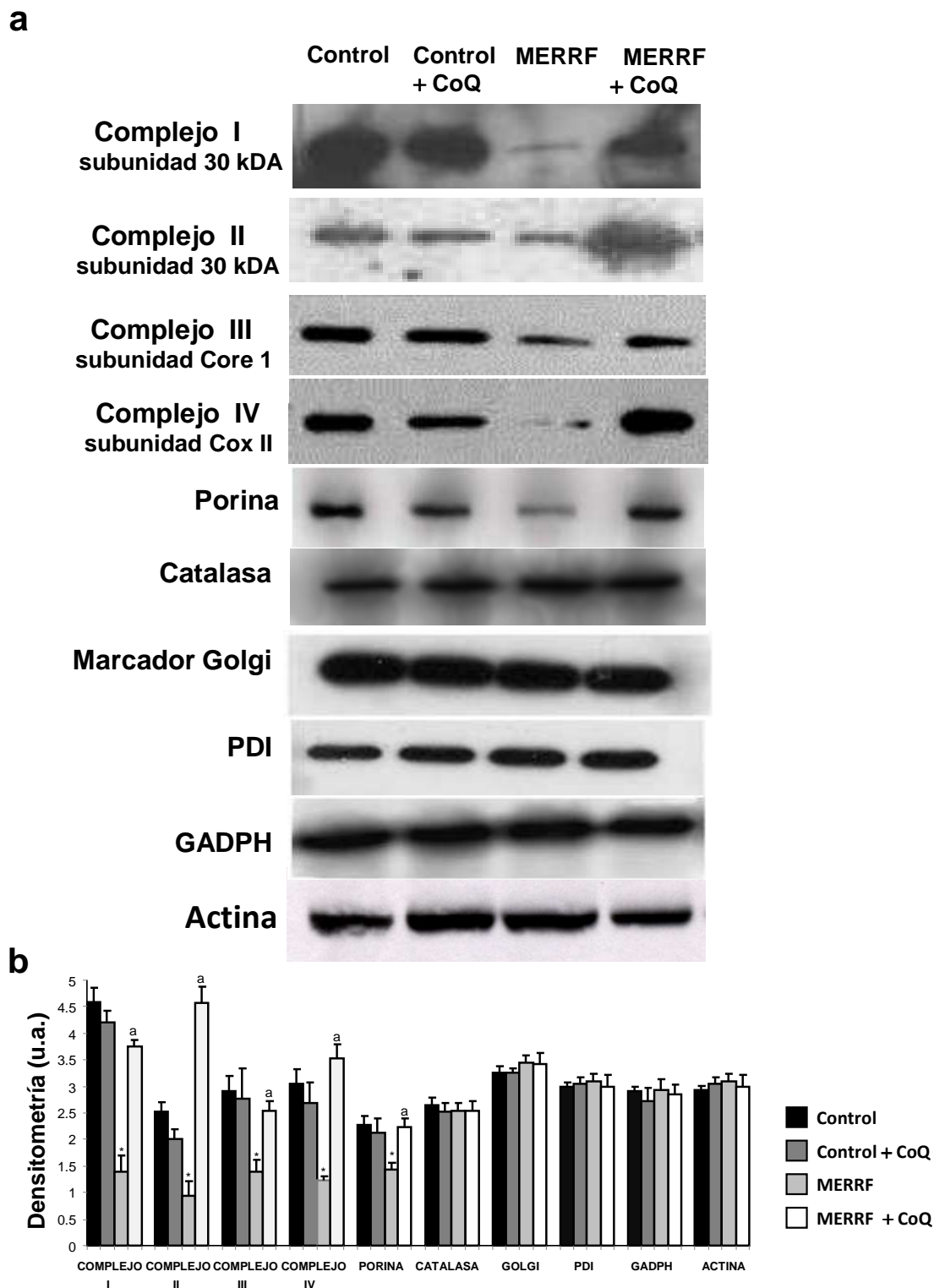


Figura 28. **Mitofagia en fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF.** (a) Expresión de los niveles de proteínas de diferentes orgánulos medida por Western blotting como se describe en el apartado Material y Métodos. Proteínas mitocondriales (Porina, Complejo I (subunidad 30 kDa), Complejo II (subunidad 30 kDa), Complejo III (subunidad core 1) y Complejo IV (subunidad COX II), , proteínas específicas de peroxisomas (Catalasa), marcadores de Golgi (Golgi Marker) y Retículo endoplasmático (PDI). La expresión de GADPH y Actina fueron usadas como control de carga. (b) Densitometría de la expresión de proteínas de los distintos orgánulos realizadas por Western-Blotting con el software ImageJ. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,01$ entre fibroblastos control y fibroblastos MERRF. ^a $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ.

6.3 Efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ sobre las alteraciones fisiopatológicas en 3 líneas de fibroblastos MERRF con la mutación 8344A>G.

Para confirmar los efectos beneficiosos del tratamiento con CoQ en la fisiopatología celular de los fibroblastos MERRF con la mutación 8344A>G, determinamos los niveles de producción de ROS, el contenido de H₂O₂, los niveles de ATP, y el número de vacuolas ácidas antes y después del tratamiento con CoQ (100 µM) durante 72 horas, en la línea celular de fibroblastos (MERRF-1) y dos líneas adicionales de fibroblastos (MERRF-2 y MERRF-3) portadoras de la mutación 8344A>G.

Los Niveles de la producción de ROS y el contenido de H₂O₂ estaban incrementados significativamente en las tres líneas celulares de fibroblastos MERRF (MERRF-1, MERRF-2, y MERRF-3) (Figura 29a y 29b).

El tratamiento de estos cultivos celulares con CoQ redujo de forma considerable los niveles ROS y H₂O₂ en los fibroblastos MERRF, sin tener ningún efecto en los cultivos de fibroblastos de pacientes control libres de la enfermedad. Las 3 líneas celulares de fibroblastos MERRF (MERRF-1, MERRF-2, y MERRF-3) contenían menores niveles de ATP comparado con los valores de los fibroblastos controles. El tratamiento con CoQ provocó un aumento significativo en los niveles intracelulares de ATP en las 3 líneas de fibroblastos MERRF, pero no tuvo ningún efecto en los fibroblastos controles.

Todo esto sugiere que el tratamiento con CoQ in vitro es eficaz sobre la bioenergética celular en estos modelos celulares (Figura 29c).

Los resultados obtenidos con la tinción del fluoróforo LysoTracker mostró un mayor número de vacuolas ácidas en los fibroblastos del paciente MERRF-1 de 1,8 veces, del paciente MERRF-2 de 1.5 veces y del paciente MERRF-3 de 1.2 veces comparados con los fibroblastos controles.

El tratamiento de los cultivos celulares con CoQ tuvo un efecto moderado en la tinción con LysoTracker en los fibroblastos control; por el contrario su efecto disminuyó significativamente la tinción con LysoTracker en las líneas celulares de

fibroblastos MERRF (Figura 29d). Estos resultados sugieren que el tratamiento de CoQ es eficaz en la prevención de la activación de la autofagia en los modelos celulares MERRF. Es interesante señalar que el estrés oxidativo (ROS), los niveles de ATP, y la actividad lisosomal estaban correlacionados con la proporción de DNA mitocondrial mutado en los fibroblastos derivados de pacientes MERRF con la mutación A8344G. Los fibroblastos MERRF-1 presentó una alta heteroplasmia (57%) y son los que manifestaron mayores niveles de producción de ROS, elevada actividad lisosomal y niveles de ATP más bajos, que los fibroblastos MERRF-2 (35% heteroplasmia) y los fibroblastos MERRF-3 (8% heteroplasmia).

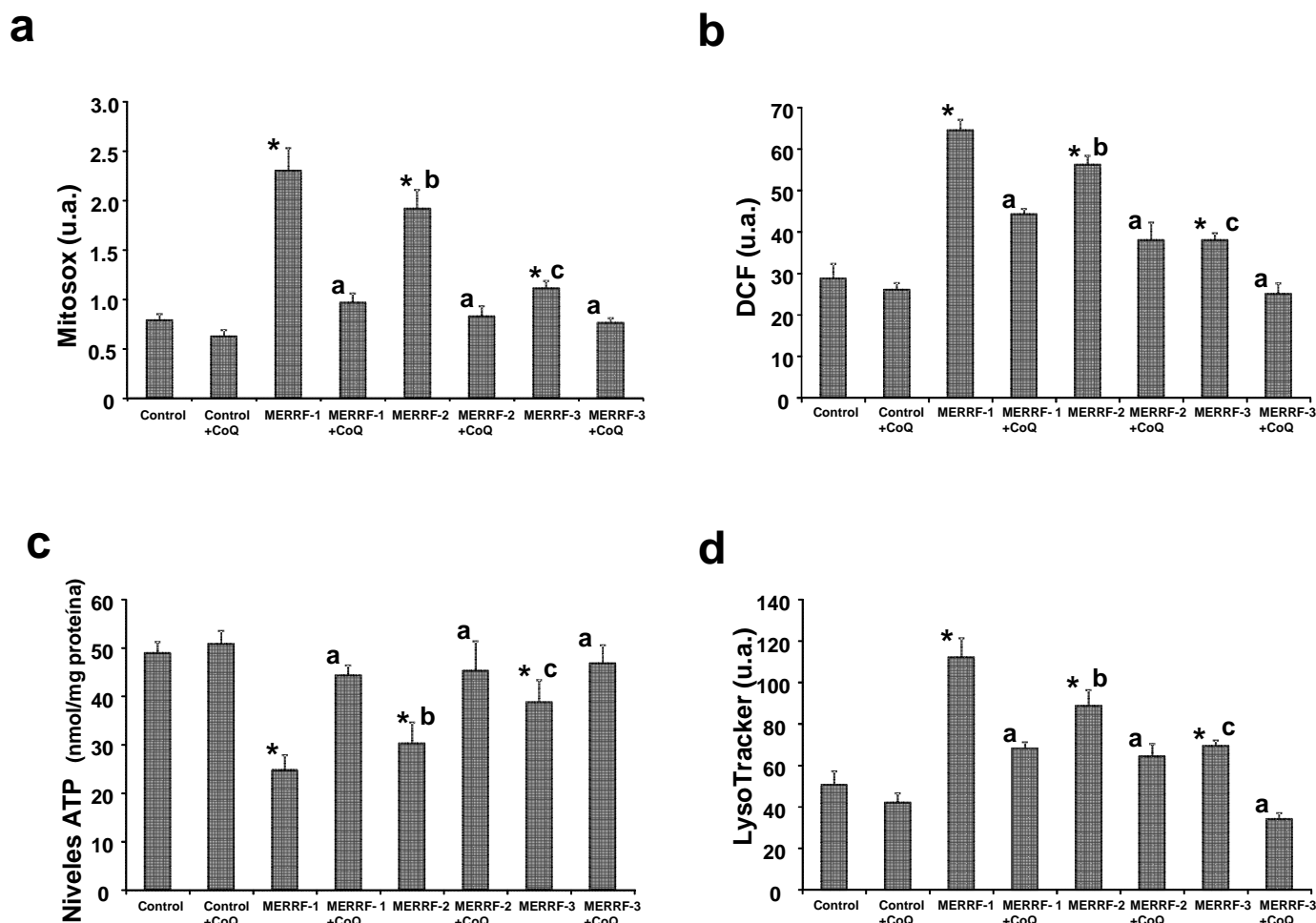


Figura 29 . **Efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ (CoQ) en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), los niveles de adenosín-5'-trifosfato (ATP), y la tinción con LysoTracker red DND-99 en tres líneas de fibroblastos derivados de pacientes con epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (MERRF) portadores de la mutación 8344A>G.** (a) Niveles de la producción especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales, concretamente del anión superóxido mitocondrial O₂⁻, en los fibroblastos controles y en los fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF (MERRF-1, MERRF-2 y MERRF-3), medidos con MitoSOX™ un indicador fluorescente rojo específico de la cantidad de los niveles anión superóxido mitocondrial O₂⁻, datos referidos a la masa mitocondrial determinada con el uso de 10-N-nonil naranja de acridina (NAO) sonda fluorescente se une específicamente a la cardiolipina presente en la membrana mitocondrial, mediante análisis por citometría de flujo. Datos expresados en unidades arbitrarias (u.a.). (b) Niveles intracelulares de H₂O₂, en los fibroblastos controles y en los fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF (MERRF-1, MERRF-2 y MERRF-3) cuantificados con el colorante redox-sensible (5-(6-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (CM-H₂DCFDA), mediante análisis por citometría de flujo. Datos expresados en unidades arbitrarias (u.a.). (c) Niveles de adenosín-5'-trifosfato (ATP) medido tal como se describe el apartado de "Material y métodos", en los fibroblastos controles y en los fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF (MERRF-1, MERRF-2 y MERRF-3). (d) Cuantificación de vacuolas ácidas mediante citometría de flujo con la tinción con LysoTracker red DND-99, en fibroblastos control y en los fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF (MERRF-1, MERRF-2 y MERRF-3) portadores de la mutación 8344A>G, por citometría de flujo. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (u.a.). Sin tratar y tratados con Coenzima Q₁₀ a una concentración de 100 μM durante 72 horas. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (u.a.). Para los fibroblastos control, los datos representan la media ± DS de 2 líneas diferentes de fibroblastos control. Los datos mostrados representan la media ± DS de 3 experimentos independientes. * p < 0,01 entre fibroblastos control y fibroblastos MERRF. ^ap < 0,01 entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ.

6.4 Estudio de cíbridos transmitocondriales con la mutación MERRF 8344A>G.

Las alteraciones fisiopatológicas caracterizadas en los fibroblastos de pacientes MERRF fueron igualmente estudiadas en cíbridos transmitocondriales con la mutación MERRF 8344A>G para poder así confirmar el carácter patogénico de esta mutación y los efectos beneficiosos del CoQ.

Para confirmar que la deficiencia de CoQ y la activación de la autofagia cuantificamos los niveles de CoQ, el contenido intracelular de ATP, la proliferación celular, la producción de especies reactivas de oxígeno y las vacuolas ácidas en cíbridos controles y en cíbridos con la mutación MERRF 8344A>G. Los cíbridos transmitocondriales con los que hemos trabajado presentaban una carga mutacional o heteroplasmia del 99 %. Como control se ha utilizado una línea de cíbridos sin la mutación MERRF.

La determinación de los niveles de CoQ₁₀ y de ATP en cíbridos MERRF 8344A>G, mostraron una significativa deficiencia de un 54% y de un 62% respectivamente (Figuras 30a y 30b) comparado con los cíbridos controles. Los cíbridos MERRF también mostraron una menor tasa de proliferación celular comparada con los cíbridos controles. El tratamiento con CoQ a una concentración de 100 µM durante 72 horas dio como resultado un aumento significativo en los niveles celulares de ATP y la tasa de proliferación celular se incrementó el doble en los cíbridos MERRF, sin tener ningún efecto sobre los cíbridos controles (Figura 30c).

Confirmada la deficiencia de CoQ y la disfunción mitocondrial en los cíbridos MERRF y para verificar si estas alteraciones se asocian con un aumento de la producción de ROS mitocondriales y la activación de la autofagia. Se evaluó mediante incubación con MitoSOX, fluoróforo que detecta el anión O₂⁻ mitocondrial, la producción de ROS mitocondriales y se cuantificó con LysoTracker Red DND-99, un fluoróforo que típicamente se concentran en vacuolas ácidas, su número, en los cíbridos controles y cíbridos MERRF. La fluorescencia se cuantificó mediante citometría de flujo. Mostrando niveles muy superiores de ROS mitocondriales en los cíbridos MERRF, de hasta 6 veces y el doble de vacuolas

ácidas, comparados con los cíbridos controles. Estas alteraciones nos sugieren un alto nivel de estrés oxidativo y la activación de la autofagia en los cíbridos MERRF. El tratamiento con CoQ a una concentración de 100 μ M durante 72 horas, redujo significativamente las ROS mitocondriales y el número de vacuolas ácidas en los cíbridos MERRF, sin tener ningún efecto sobre los cíbridos controles (Figuras 30d y 30e).

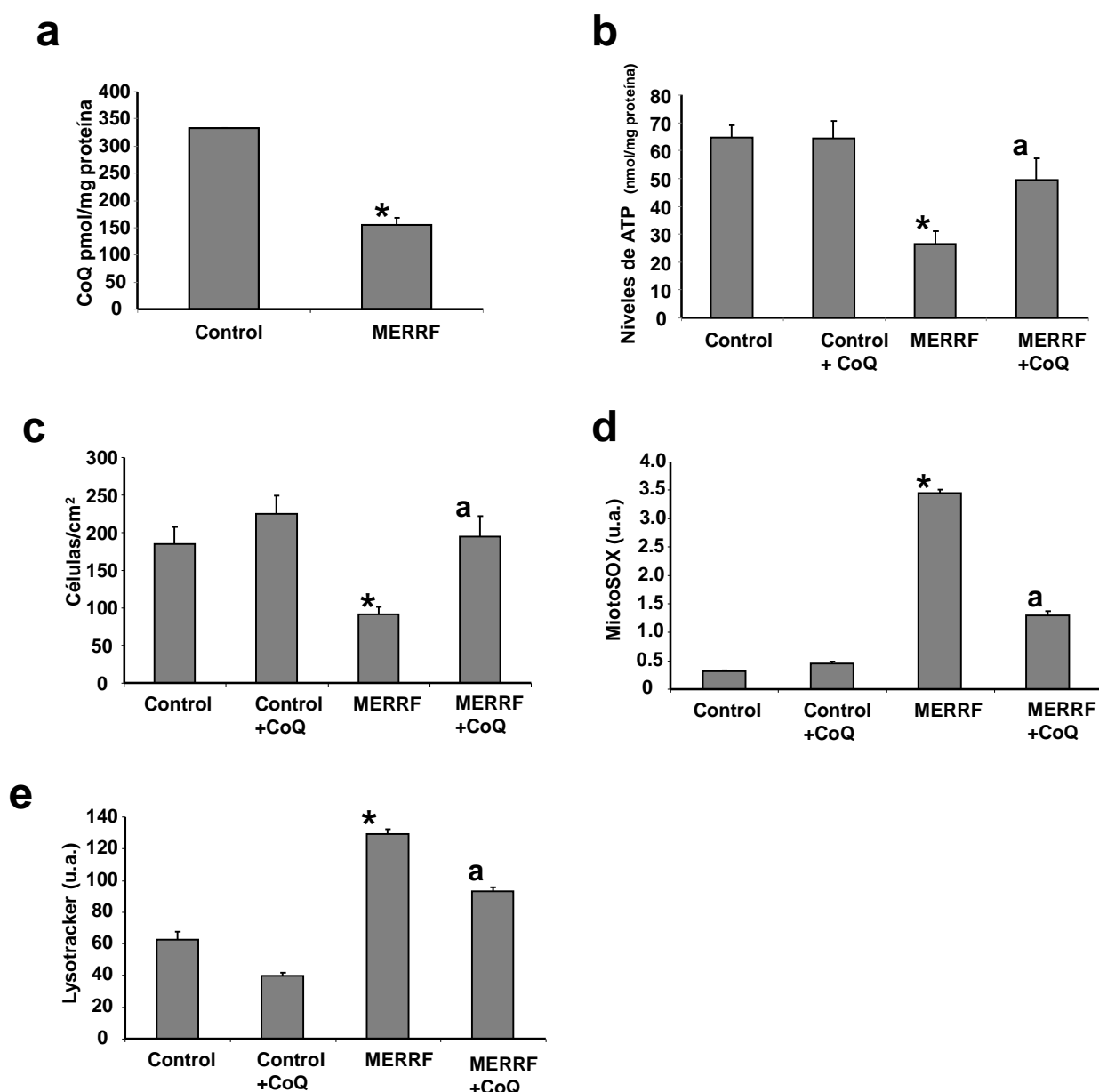


FIGURA 30. Contenido de CoQ, niveles de ATP, proliferación celular, especies reactivas de oxígeno (ROS) y niveles de vacuolas ácidas en los híbridos transmitocondriales con la mutación MERRF 8344A>G. (a) Contenido de CoQ₁₀ en los híbridos con la mutación MERRF 8344A>G. El contenido de CoQ₁₀ fueron analizados por HPLC siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. (b) Cuantificación de los niveles de adenosín-5'-trifosfato (ATP) mediante el uso de un luminómetro, se usó un kit de determinación de ATP y siguiendo el protocolo que se describe en el apartado de "Material y Métodos". Se representa los niveles de ATP alcanzados por los híbridos MERRF tras el tratamiento con CoQ transcurridas 72 horas a una concentración de 100 μ M. (c) Cuantificación de la tasa de proliferación celular de fibroblastos con y sin tratamiento con CoQ. Se utilizó un microscopio invertido con objetivo 40X (Olympus IX71) en cuatro campos distintos elegidos al azar y siguiendo el protocolo que se describe en el apartado de Material y Métodos. Se representa la proliferación celular alcanzados por los híbridos transmitocondriales tras el tratamiento con CoQ transcurridas 72 horas a una concentración de 100 μ M. (d) Producción de ROS mitocondrial usando el marcador MitoSOX, en híbridos control y híbridos MERRF con la mutación 8344A>G, sin tratar y tratados con CoQ a una concentración de 100 μ M. Los resultados se expresan como la ratio de señal de MitoSOX/10-N-nonil naranja de acridina (NAO). (e) Cuantificación de la masa lisosomal por citometría de flujo con la tinción con Lysotracker red DND-99, en híbridos control y híbridos MERRF portadores de la mutación 8344A>G, sin tratar y tratados con CoQ a una concentración de 100 μ M. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (u.a.). Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,01$ entre híbridos control y híbridos mutantes MERRF. ^a $p < 0,01$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ.

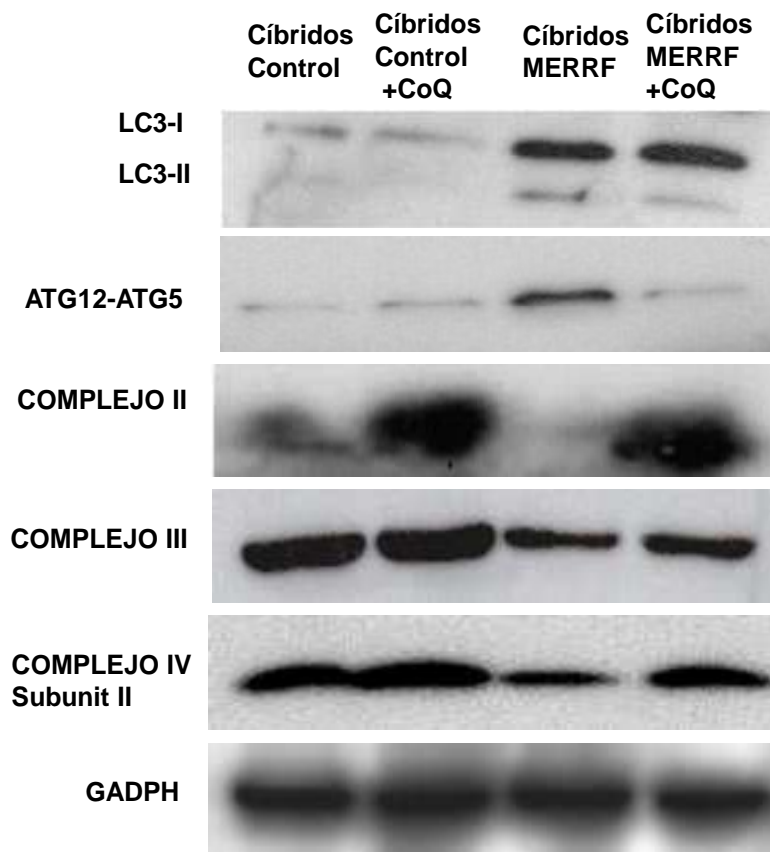
Para llevar a cabo la confirmación de la activación de la mitofagia en cíbridos MERRF. En primer lugar, realizamos ensayos por Western Blotting donde analizamos los niveles de expresión de proteínas mitocondriales, estas fueron, Complejo II (subunidad 30 kDa), Complejo III (subunidad core 1), Complejo IV (subunidad COX II), los cuales estaban disminuidos significativamente comparados con los cíbridos control.

En segundo lugar, analizamos la expresión proteica de ATG12-ATG5 y LC3 que codifican proteínas implicadas en la autofagia. La expresión de estos 2 genes mostraron un incremento significativo en los cíbridos MERRF, comparadas con los cíbridos controles.

En este ensayo observamos que los niveles de las proteínas autofágicas se encontraban aumentadas, 2 veces la relación LC3-II/LC3-I y 1,8 veces para el conjugado ATG12-ATG5.

El tratamiento de los cultivos celulares con CoQ redujo el nivel de expresión de estas proteínas autofágicas en los cíbridos MERRF, pero tuvo poco efecto en la expresión de estas proteínas en los cíbridos control. Por el contrario la expresión de los complejos II,III y IV mitocondriales, estaban reducidos 3.5,2.2 y 1.3 veces, respectivamente en los cíbridos MERRF, el tratamiento con CoQ aumentó los niveles de expresión de estas proteínas mitocondriales en los cíbridos MERRF (Figuras 31a y 31b).

a



b

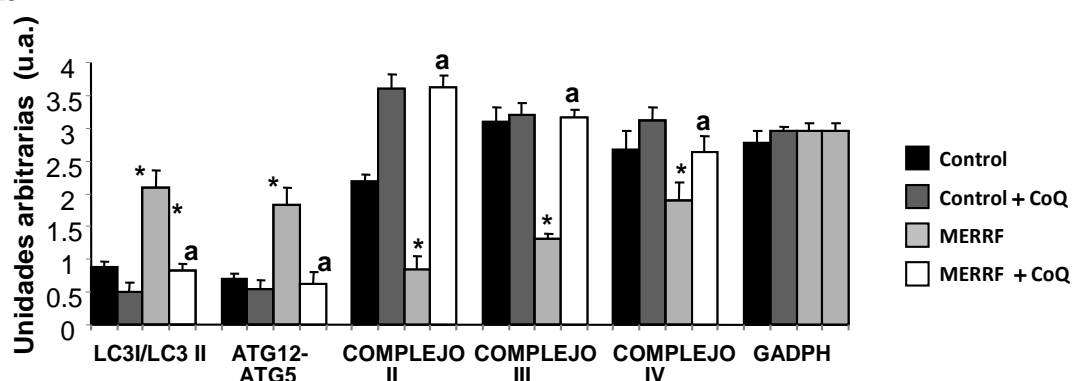


Figura 31. **Análisis de las proteínas autofágicas y mitocondriales en los cíbridos transmitocondriales con la mutación MERRF 8344A>G mediante Western Blotting.** (a) Niveles de expresión en las distintas proteínas autofágicas mediante ensayos Western-Blotting. la relación LC3I/LC3II es mayor en los cíbridos MERRF comparada a la expresión encontrada en los cíbridos control. La proteína ATG12, que forma complejo con ATG5, aparece con niveles aumentados en los cíbridos MERRF comparado con los cíbridos control. Por otro lado, El tratamiento con CoQ a 100 μ M durante 72 horas fue capaz de revertir estos niveles proteicos. La expresión de los niveles de proteínas mitocondriales, Complejo I (subunidad 30 kDa), Complejo II (subunidad 30 kDa), y Complejo IV (subunidad COX II, era menor en los cíbridos MERRF comparada a la expresión encontrada en los cíbridos control. El tratamiento con CoQ a 100 μ M durante 72 horas fue capaz de aumentar estos niveles proteicos en los cíbridos mitocondriales con la mutación MERRF 8344A>G. La expresión de GADPH fue usada como control de carga. (b) Densitometría de la expresión de proteínas realizadas por Western-Blotting con el software ImageJ. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (u.a.). Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,01$ entre cíbridos control y cíbridos mutantes MERRF. ^a $p < 0,01$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ.

Para confirmar la degradación selectiva de mitocondrias (mitofagia) en estos modelos celulares, se realizó ensayos de inmunofluorescencia por microscopía con el citocromo c, como proteína mitocondrial y como marcador de autofagosomas se usó la proteína LC3. En las células mutantes control, la tinción de Citocromo c en verde reveló una red tubular de las mitocondrias, mientras que LC3 en rojo, era apenas detectable. En los cíbridos MERRF, observamos mitocondrias pequeñas y fragmentadas que eran positivas para LC3 (Figura 32a). En una mayor ampliación de una imagen de un cíbrido mutante MERRF (Figura 32b), la doble inmunotinción con los marcadores mostró colocalización entre el marcador mitocondrial Citocromo c y el marcador de autofagosomas, la proteína LC3. La flecha roja indica las mitocondrias donde no existe colocalización (colocalización $r = -0.0145$) y eran negativas para LC3 y la flecha amarilla indica puntos de colocalización “punctata” (colocalización $r = 0.8841$) entre ambos marcadores Citocromo c/LC3, mostrando la degradación de mitocondrias, lo que hace evidente también procesos mitofágicos en los cíbridos transmitocondriales con la mutación MERRF 8344A>G. El tratamiento con CoQ redujo los niveles de la proteína LC3 y los puntos de colocalización LC3/Citocromo c, en los cíbridos MERRF (Figura 32c).

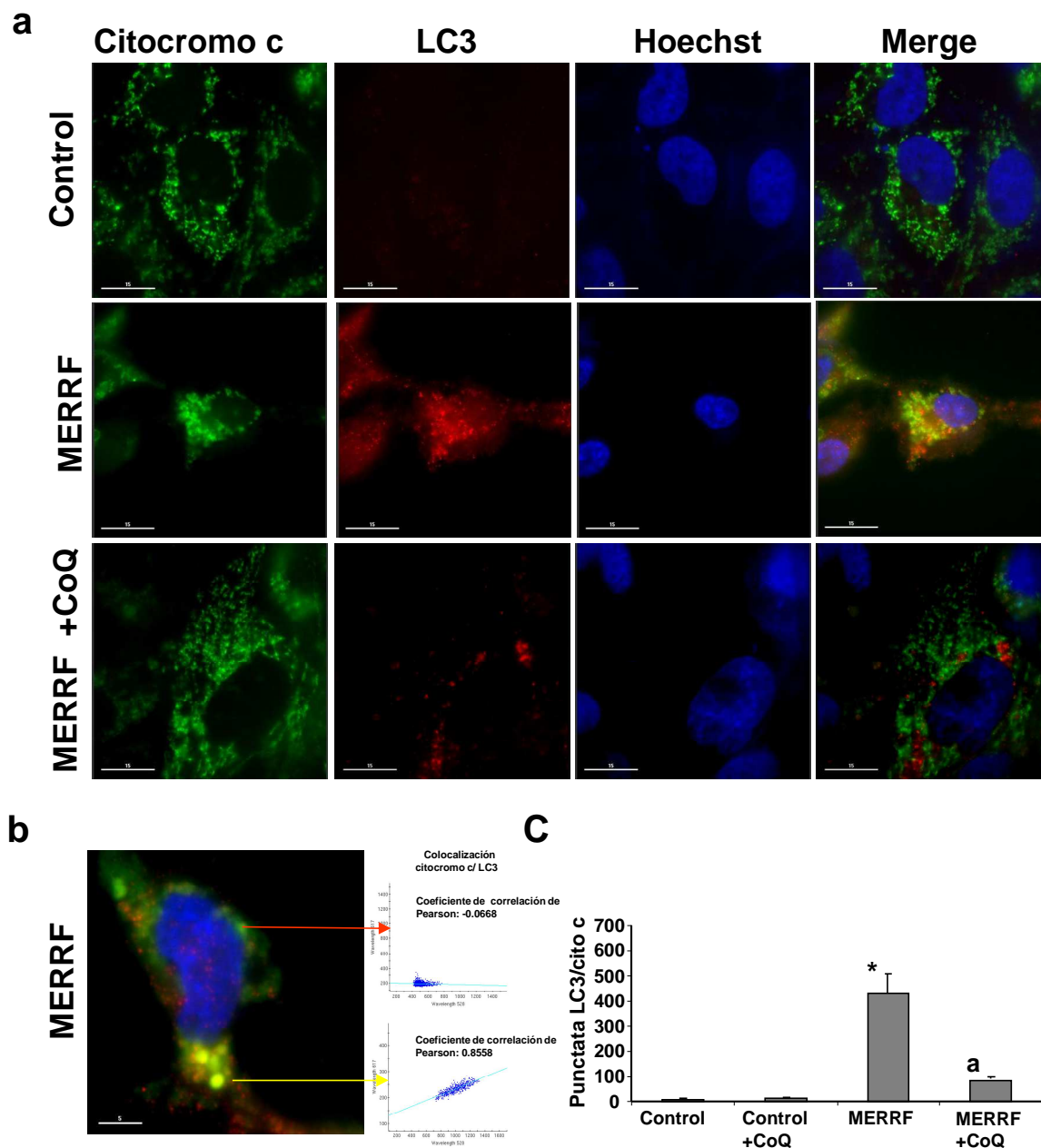


Figura 32. **Degradación mitocondrial y autofagosomas en los cíbridos transmitocondriales con la mutación MERRF 8344A>G.** (a) Imágenes de fluorescencia mediante el uso de LC3 como marcador de autofagosomas y Citocromo c como marcador mitocondrial de los cíbridos control y de los cíbridos mutantes MERRF tras el tratamiento con Coenzima Q₁₀ (100μM CoQ). (b) Ampliación de un área de la imagen de un cíbrido MERRF, las flechas indican los puntos de colocalización “punctata” entre ambos marcadores. (c) Cuantificación de los puntos de colocalización (“punctata”) LC3/Citocromo c, en los cíbridos control y en los cíbridos transmitocondriales con la mutación MERRF 8344A>G. La colocalización de ambos marcadores se calculó mediante el software DeltaVisionssystem (Applied Precision; Issaquah,) que permite calcular mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Los datos mostrados representan la media ± DS de 3 experimentos independientes. * p <0,01 entre cíbridos control y cíbridos mutantes MERRF. ^ap<0,01 entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ.

TRATAMIENTO CON COENZIMA Q₁₀ Y LA CHAPERONA FARMACOLÓGICA NAdBT-AIJ EN MODELOS CELULARES DE LA ENFERMEDAD DE GAUCHER.

Los pacientes con la enfermedad lisosomal de Gaucher portadores de la mutación L444P/L444P manifiestan un fenotipo clínico con afectación neurológica grave, caracterizada clínicamente por hepatoesplenomegalia, problemas óseos, cardiopatía, insuficiencia respiratoria y frecuentemente asociada a una encefalopatía progresiva acompañada de apraxia oculomotora, epilepsia mioclónica y ataxia.

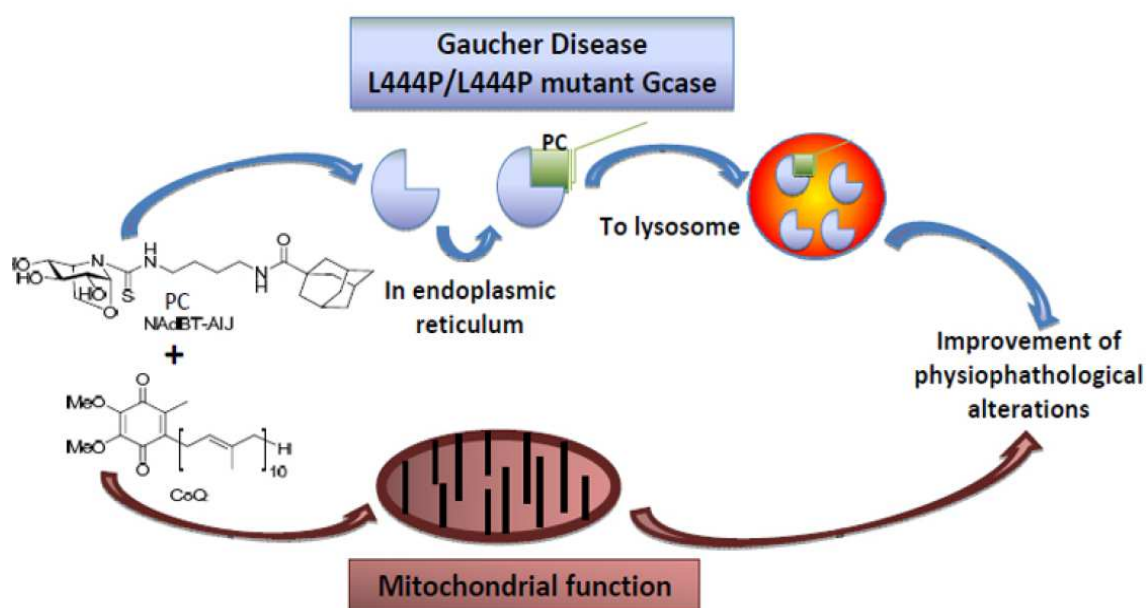
La TRE, no es muy eficaz en este tipo de pacientes que muestran implicación del SNC ya que las enzimas recombinantes no atraviesan la barrera hematoencefálica.

Para llevar a cabo nuestra estrategia terapéutica, utilizamos los iminoazúcares sp2 como la NAdBT-AIJ con función de CF. Este compuesto es capaz de unirse a la enzima β -glucocerebrosidasa (GBA) humana que se encuentra mutada y es disfuncional en los enfermos que padecen la enfermedad de Gaucher, y provocar un aumento de actividad catalítica de la enzima GBA en el compartimento lisosomal.

La mutación L444P/L444P es especialmente refractaria a los tratamientos disponibles, incluida la TCF, por lo que existe la necesidad urgente de desarrollar estrategias terapéuticas que sean útiles en enfermos con este genotipo. Por tanto nos propusimos el desarrollo de estrategias que potencien la acción de las chaperonas farmacológicas mediante la combinación con otros compuestos activos que actúen sobre la disfunción mitocondrial o el desequilibrio autofágico que presenta este tipo de enfermedades.

Para ello utilizamos la CoQ un antioxidante y potenciador energético, utilizado frecuentemente en el tratamiento de las enfermedades mitocondriales y otras enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson [215] e incluso en otras alteraciones lisosomales [134]. Nuestra hipótesis de partida era que el CoQ podría actuar sobre la disfunción mitocondrial secundaria y el desequilibrio autofágico que presenta la enfermedad de Gaucher.

En esta segunda parte, describimos como la combinación de la chaperona farmacológica NAdBT-AIJ y la coenzima Q₁₀ (CoQ) producen un efecto sinérgico positivo, ejerciendo un beneficio superior de los que producen los tratamientos individuales, en ensayos realizados con células de pacientes con la enfermedad de Gaucher portadores de la mutación L444P/L444P.



6.5. Disfunción mitocondrial secundaria en los fibroblastos de pacientes Gaucher.

Este segundo estudio lo llevamos a cabo en fibroblastos derivados de pacientes con la enfermedad de Gaucher que cursan con afectación del sistema nervioso central, portadores de una de las mutaciones más frecuente, la L444P en homocigosis y fueron denominados como Gaucher-A, Gaucher-B y Gaucher-C.

6.5.1. Estudio de la función mitocondrial en los fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Gaucher.

Para determinar la presencia de la disfunción mitocondrial en los fibroblastos Gaucher, medimos la actividad de las enzimas de la CRM, los niveles de CoQ, los niveles intracelulares de ATP, el $\Delta\Psi_m$ y la generación de ROS mitocondriales en 2 controles libres de la enfermedad y en 3 fibroblastos patológicos con la mutación L444P/L444P (Gaucher A, B y C).

6.5.2 Determinación actividad de la enzimas de la CRM y el contenido de CoQ₁₀.

En primer lugar determinamos las actividades enzimáticas de la CRM, específicamente, medimos las actividades enzimáticas de la NADH deshidrogenasa (Complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), citocromo c oxidoreductasa (Complejo III), succinato-citocromo c reductasa (complejo II+III). Igualmente, medimos la actividad de la citrato sintasa para normalizar la actividades de la CRM al contenido mitocondrial.

Los fibroblastos Gaucher A,B y C mostraron una disminución porcentual de un 20% en las actividades enzimáticas de la CRM comparadas con los fibroblastos controles (Figura 33a). Dado el importante papel de la CoQ en la función de mitocondrial, se ha sugerido que los niveles de CoQ podría ser un marcador biológico útil de la función mitocondrial [216]. Por ello, determinamos si los fibroblastos Gaucher

tenían deficiencia de CoQ. Los fibroblastos Gaucher mostraron una disminución de un 24% en los niveles de CoQ respecto a los fibroblastos control (Figura 33b).

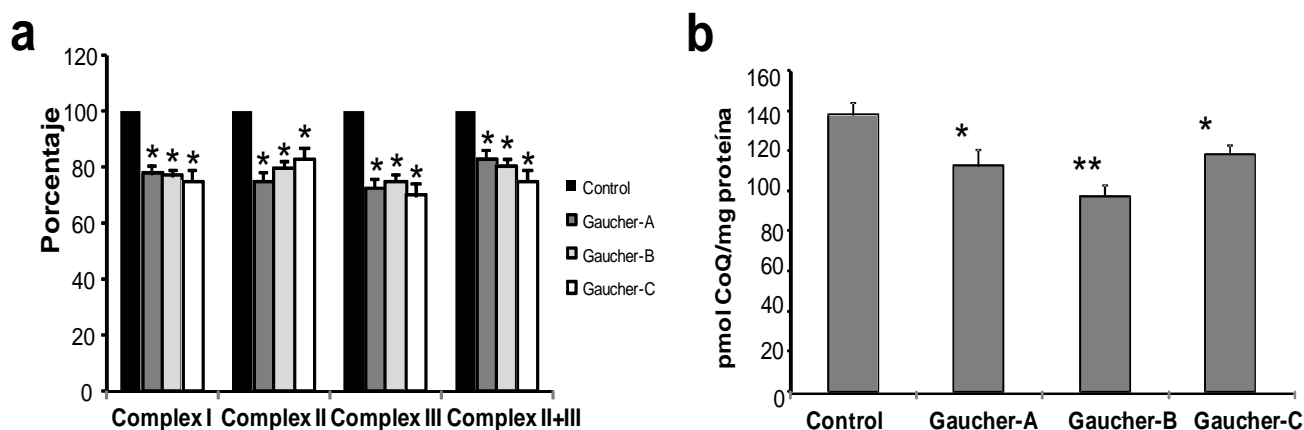


FIGURA 33. Disfunción mitocondrial en fibroblastos Gaucher. **(a)** Porcentaje de las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial de los complejo I, II, III y II + III en fibroblastos control y Gaucher, se determinó como se describe en Materiales y Métodos. **(b)** Contenido de CoQ en fibroblastos control y fibroblastos de Gaucher, se determinaron mediante extracción con hexano y separación por HPLC como se describe en Materiales y Métodos. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes.* $p < 0,05$ entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. ** $p < 0,01$ entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher.

6.5.3 Determinación del potencial de membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

Para confirmar las consecuencias funcionales de la menor actividad de las enzimas de la CRM y de la deficiencia en los niveles de CoQ en los fibroblastos Gaucher, se determinó el $\Delta\Psi_m$, dado que las alteraciones del $\Delta\Psi_m$ reflejan alteraciones funcionales de las mitocondrias. Determinamos el $\Delta\Psi_m$ mediante citometría de flujo utilizando la sonda Mitotracker Red CMXRos, expresando los valores como la media de la fluorescencia observada. El $\Delta\Psi_m$ estaba significativamente reducido en los fibroblastos Gaucher respecto a los fibroblastos control (Figura 34a). La despolarización mitocondrial fue confirmada calculando la ratio entre el éster metílico de Tetrametilrodamina (TMRM), un colorante selectivo de mitocondrias funcionalmente activas que es captado dependiendo del $\Delta\Psi_m$, y MitoTracker Green FM (MTG), un marcador fluorescente de masa mitocondrial e independiente del $\Delta\Psi_m$, mediante citometría de flujo (Figura 34b). Por otra parte realizamos un análisis mediante microscopía de fluorescencia con la sonda Mitotracker Red

CMXRos, las imágenes mostraron una red mitocondrial con mitocondrias tubulares con alto potencial mitocondrial en los fibroblastos control y una gran cantidad de mitocondrias pequeñas y redondas con bajo $\Delta\Psi_m$ en los fibroblastos Gaucher (Figuras 34c y 34d). En una ampliación de las imágenes de fluorescencia, la flecha roja señala mitocondrias tubulares con alto $\Delta\Psi_m$. La flecha amarilla indican las poblaciones de mitocondrias pequeñas, redondas y despolarizadas (Figura 34d). Las cuantificaciones de las mitocondrias despolarizadas por célula en los fibroblastos Gaucher fueron superiores comparada con los fibroblastos control (Figura 34e).

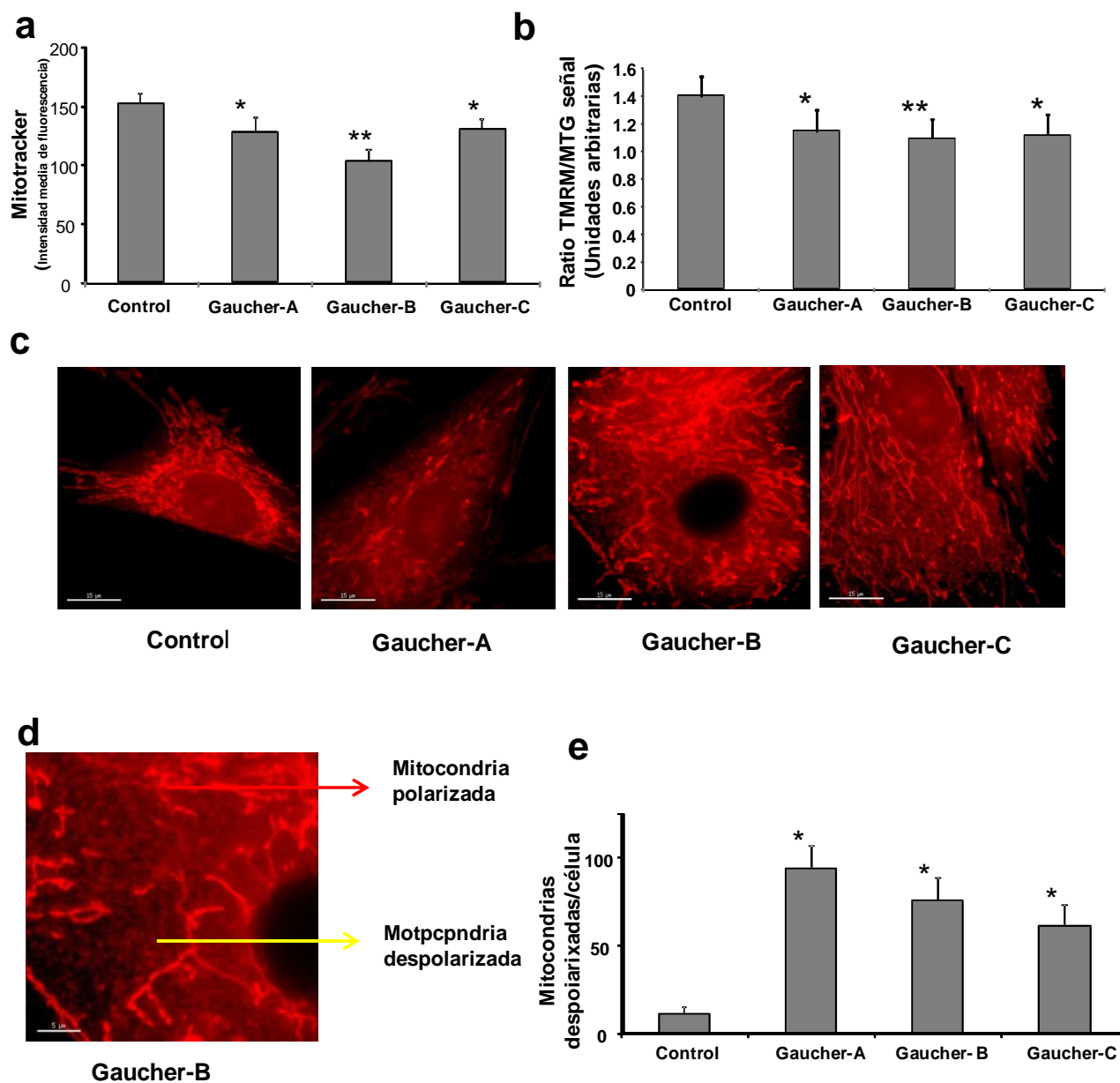


Figura 34. **Disfunción mitocondrial en fibroblastos derivados de pacientes con la enfermedad de Gaucher.** (a) Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), se evaluó mediante citometría de flujo utilizando MitoTracker RedCMXRos. Se observó una clara disminución del $\Delta\Psi_m$ en los fibroblastos Gaucher. (b) Ratio señal TMRM/MTG, confirmación de la despolarización mitocondrial en fibroblastos Gaucher comparados con los fibroblastos control mediante citometría de flujo. (c) Imágenes representativas mediante tinción con MitoTracker Red CMXRos de fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. barra de escala = 15 micras. (d) Ampliación de un área de un fibroblasto Gaucher con MitoTracker RedCMXRos. La imagen muestra una red mitocondrial con mitocondrias tubulares (flecha roja) con alto potencial mitocondrial y una red mitocondrial fragmentada con mitocondrias individuales de forma redondeada y despolarizadas indicado por una flecha amarilla. (e) Cuantificación de las mitocondrias pequeñas y despolarizadas en fibroblastos Gaucher. La cuantificación de mitocondrias despolarizadas se realizó por análisis de imágenes de fluorescencia en 100 células tomadas al azar de los cultivos de fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes.* $p < 0,05$ entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. ** $p < 0,01$ entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher.

6.5.4 Determinación de los niveles de ATP.

En una célula, la mayor parte del ATP se sintetiza a partir de ADP y fosfato mediante la fosforilación oxidativa mitocondrial. En este proceso los tres centros redox de la cadena respiratoria mitocondrial bombean hidrogeniones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, desarrollando una fuerza protón-motriz o $\Delta\Psi_m$. Esa fuerza protón-motriz permite la síntesis de ATP mediante la ATP sintasa. Los fibroblastos Gaucher mostraron una reducción significativa del $\Delta\Psi_m$ lo que sugiere una menor capacidad para producir ATP en los fibroblastos patológicos. Para ello, medimos los niveles intracelulares de ATP en los fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. Los fibroblastos Gaucher tenían disminuidos los niveles de ATP en un 30% comparado con los valores de los controles. La cuantificación de los niveles de ATP se realizó mediante luminometría utilizando un kit Determinación de ATP (Figura 35).

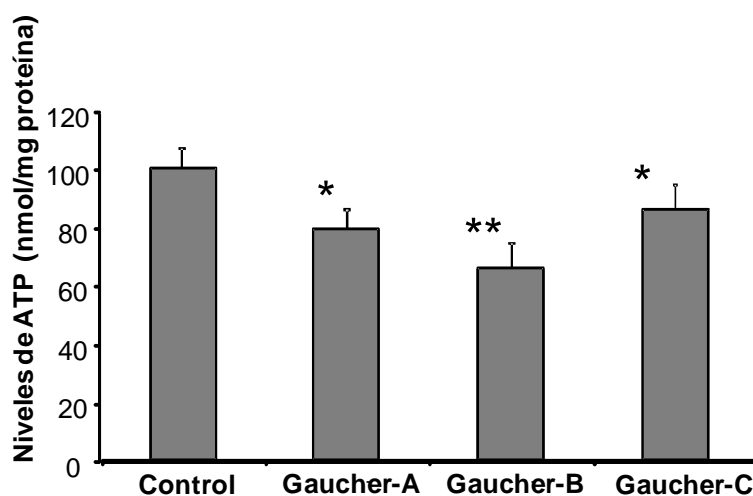


Figura 35. **Niveles de ATP en fibroblastos derivados de pacientes Gaucher con la mutación L444P/L444P.** Los fibroblastos Gaucher mostraron una significativa disminución en los niveles de ATP comparados con los fibroblastos control. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. ** $p < 0,01$ entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher.

6.8.Efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ y NAdBT-AIJ sobre la disfunción mitocondrial secundaria en los fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Gaucher.

6.8.1. Efecto del tratamiento combinado coenzima Q₁₀ y NAdBT-AIJ sobre el potencial de membrana mitocondrial y los niveles intracelulares de ATP.

Confirmada una disfunción mitocondrial secundaria en los fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Gaucher, procedimos a determinar las concentraciones óptimas de CoQ y la chaperona farmacológica NAdBT-AIJ que aumentaban la actividad de la GCasa mutada. Los resultados obtenidos indicaron que las concentraciones óptimas fueron 25µM de CoQ y 25µM de NAdBT-AIJ.

A continuación los fibroblastos control y Gaucher fueron tratados con CoQ (25µM), NAdBT-AIJ (25µM) y la combinación CoQ+NAdBT-AIJ (25µM+25µM) durante 96 horas para determinar su actuación sobre las alteraciones fisiopatológicas.

Para ello medimos el $\Delta\Psi_m$ mediante citometría de flujo con la sonda Mitotracker Red CMXRos y los niveles intracelulares de ATP por luminometría.

Tras el tratamiento con CoQ, NAdBT-AIJ y CoQ+NAdBT-AIJ, el tratamiento combinado fue el que produjo el efecto más significativo sobre el $\Delta\Psi_m$ (Figura 36a y 36b) y los niveles celulares de ATP en los fibroblastos Gaucher. Por el contrario, los tratamientos no tuvieron efecto en los fibroblastos control (Figura 36a y 36b).

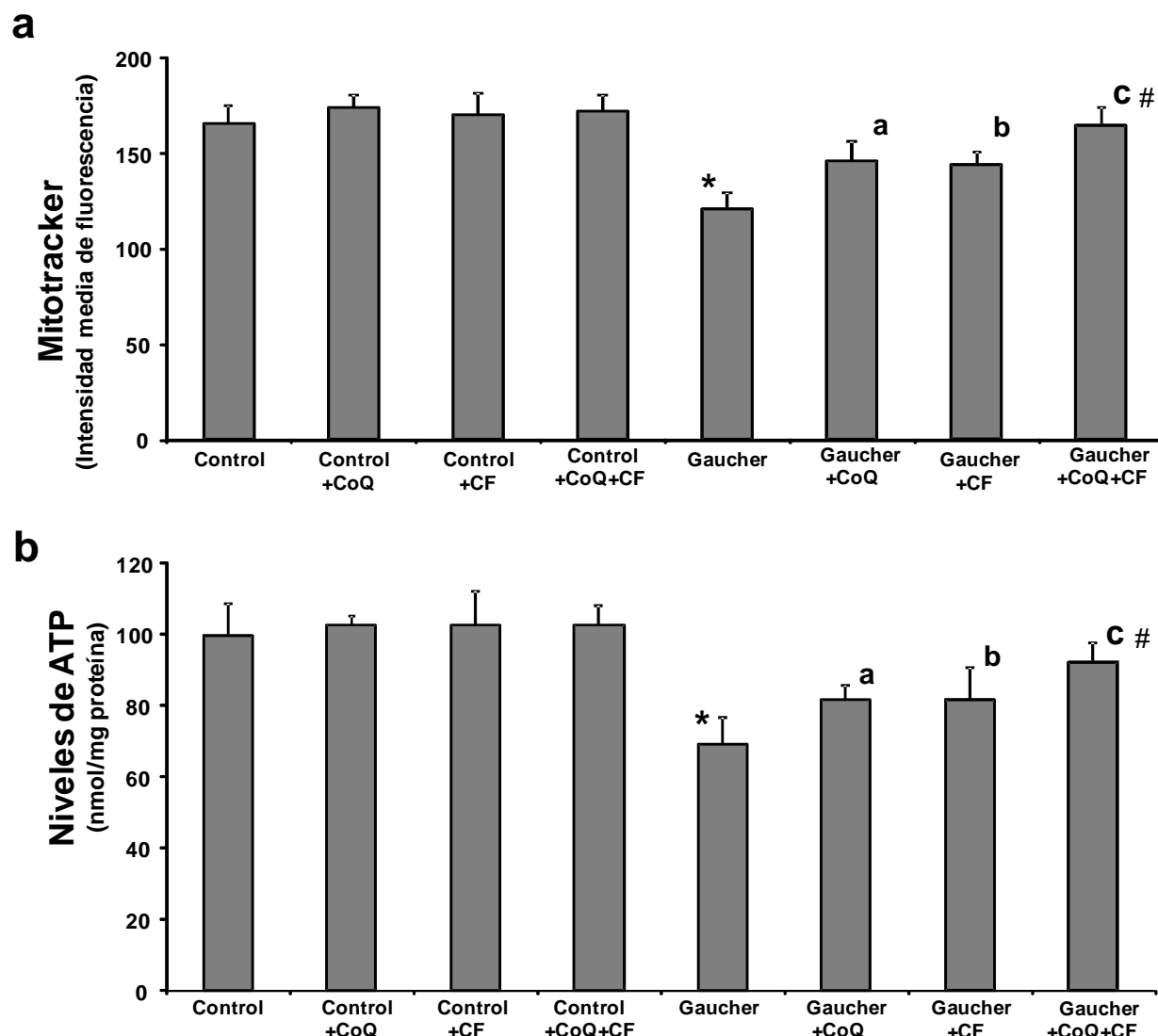


Figura 36. **Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y de los niveles de ATP en fibroblastos Gaucher con los distintos tratamientos.** (a) Representación gráfica del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) tras el tratamiento con CoQ (25 μ M), CF (25 μ M) y CoQ+CF (25 μ M+25 μ M) de los fibroblastos control y fibroblastos Gaucher transcurridas 96 horas. (b) Representación gráfica de la cuantificación de los niveles de ATP mediante el uso del luminómetro, utilizando un kit de cuantificación de ATP. Se representan los niveles de ATP alcanzados por los fibroblastos Gaucher tras el tratamiento con CoQ, CF y CoQ+CF tras 96 horas. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,01$ entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. ^a $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ. ^b $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CF. ^c $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF. [#] $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF y CoQ o CF.

La eficacia del tratamiento combinado CoQ+NAdBT-AIJ sobre el $\Delta\Psi_m$ y los niveles de ATP fue confirmada en las tres líneas de fibroblastos Gaucher L444P/L444P (Figura 37a y 37b).

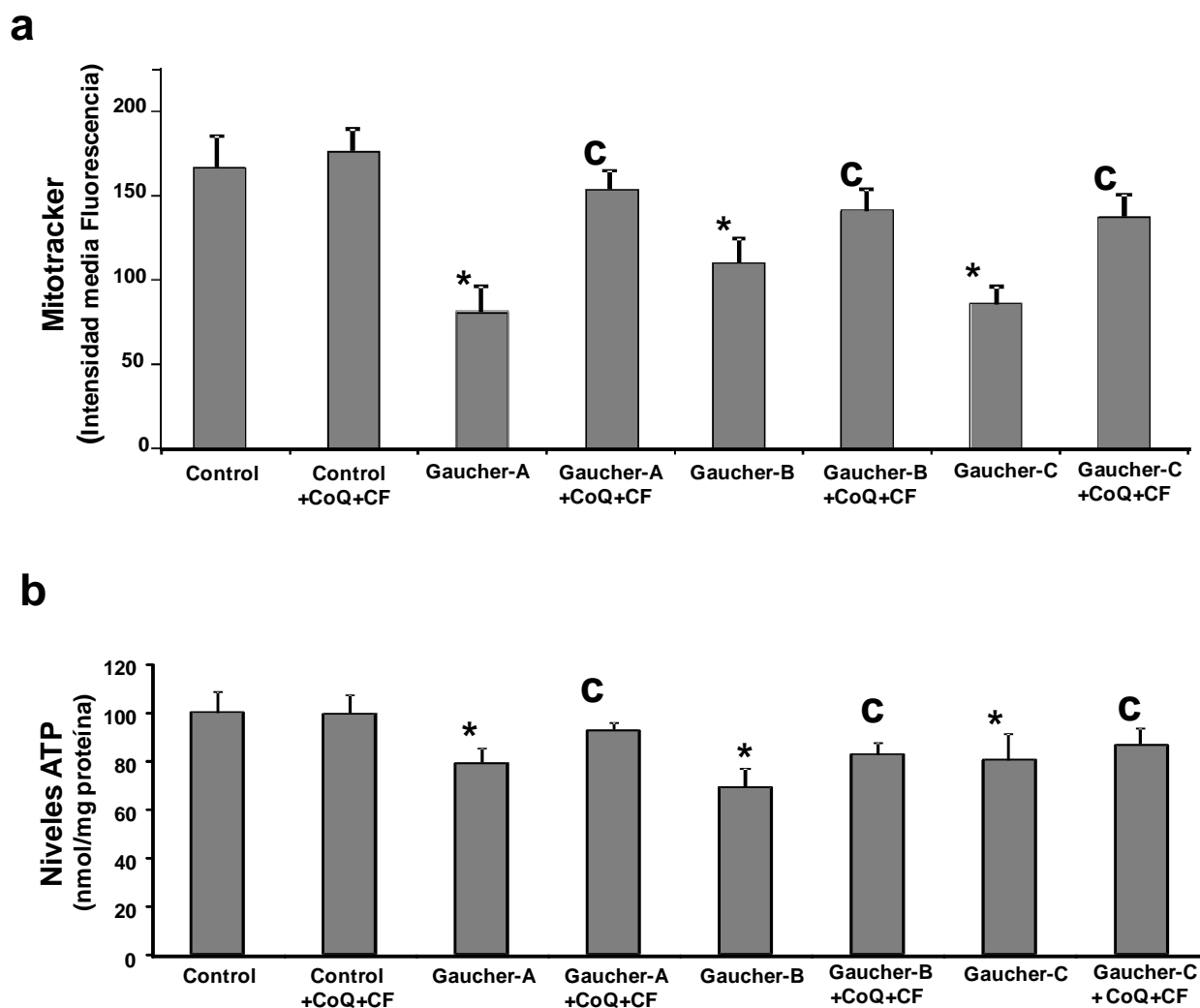


Figura 37. **Efecto de la CoQ y NAdBT-AIJ sobre la función mitocondrial en fibroblastos Gaucher.** **(a)** Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) mediante citometría de flujo usando la sonda Mitotracker Red CMXRos. **(b)** Niveles de ATP de fibroblastos control y fibroblastos Gaucher portadores de la mutación L444P/L444P con el tratamiento combinado con CoQ y NAdBT-AIJ. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y Fibroblastos Gaucher. ^c $p < 0.05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF.

6.8.2 Efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ y NAdBT-AIJ sobre la proliferación celular

A continuación determinamos el efecto de la mutación L444P/L444P sobre la tasa de proliferación celular, como indicador de la homeostasis celular. Los fibroblastos Gaucher mostraron una disminución en la tasa de proliferación comparada con los fibroblastos control. La tasa de proliferación se incrementó con los tratamientos individuales con CoQ y NAdBT-AIJ y a valores casi normales en los fibroblastos Gaucher tras el tratamiento combinado de CoQ+NAdBT-AIJ. Las células fueron contadas usando un microscopio invertido con objetivo 40X (Olympus IX71) en tres campos distintos elegidos al azar. Los resultados se expresan en células/ cm² (Figura 38).

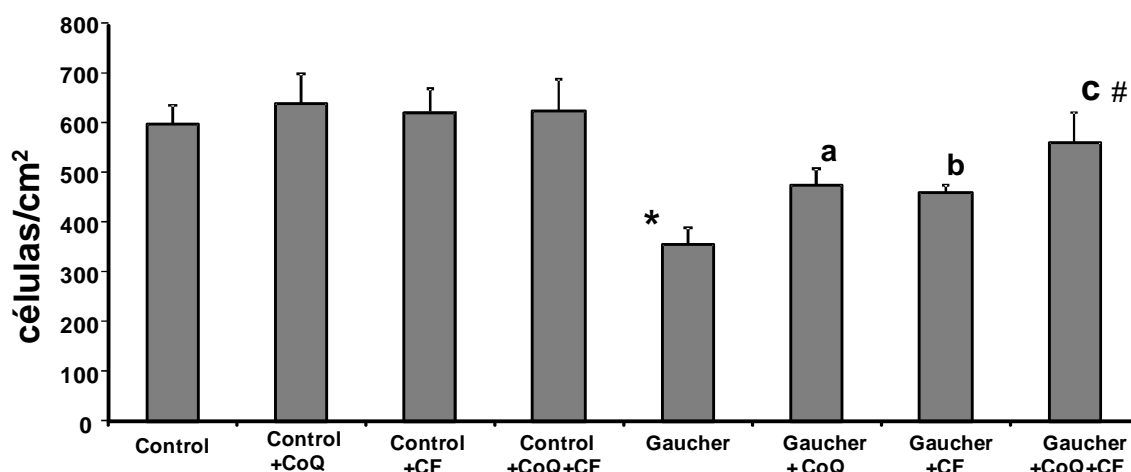


Figura 38. **Efecto de la CoQ y NAdBT-AIJ sobre la proliferación celular en fibroblastos Gaucher.** Tasa de proliferación celular de los fibroblastos con los distintos tratamientos. Se representa la proliferación celular alcanzados por los fibroblastos Gaucher tras el tratamiento con CoQ, CF y CoQ+CF tras 96 horas a una concentración de 25 μ M. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,01$ entre fibroblastos control y Fibroblastos Gaucher. ^a $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ. ^b $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con PC. ^c $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF. [#] $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+PC y CoQ o CF.

6.8.3 Efecto del tratamiento con CoQ y NAdBT-AIJ sobre la red mitocondrial.

Las alteraciones del $\Delta\Psi_m$ reflejan alteraciones funcionales de las mitocondrias. Los ensayos de inmunofluorescencia mediante la sonda Mitotracker Red CMXRos mostraron una red mitocondrial con mitocondrias tubulares con alto potencial mitocondrial en los fibroblastos control y una reducción del potencial de membrana mitocondrial en las mitocondrias de los fibroblastos Gaucher.

Para confirmar los cambios observados en el $\Delta\Psi_m$, realizamos un análisis de imágenes por microscopía de fluorescencia, marcando la proteína mitocondrial citocromo c, con un anticuerpo unido a un fluoróforo que emite en verde y el $\Delta\Psi_m$ con la sonda MitoTracker Red CMXRos. Los resultados mostraron la colocalización de la sonda MitoTracker con la tinción del marcador de citocromo c, confirmando la especificidad de la tinción de la sonda MitoTracker. Por otro lado, el tratamiento combinado (CoQ+CF) restauró tanto la morfología de la red mitocondrial como la polarización mitocondrial en los fibroblastos Gaucher (Figura 39a y 39b).

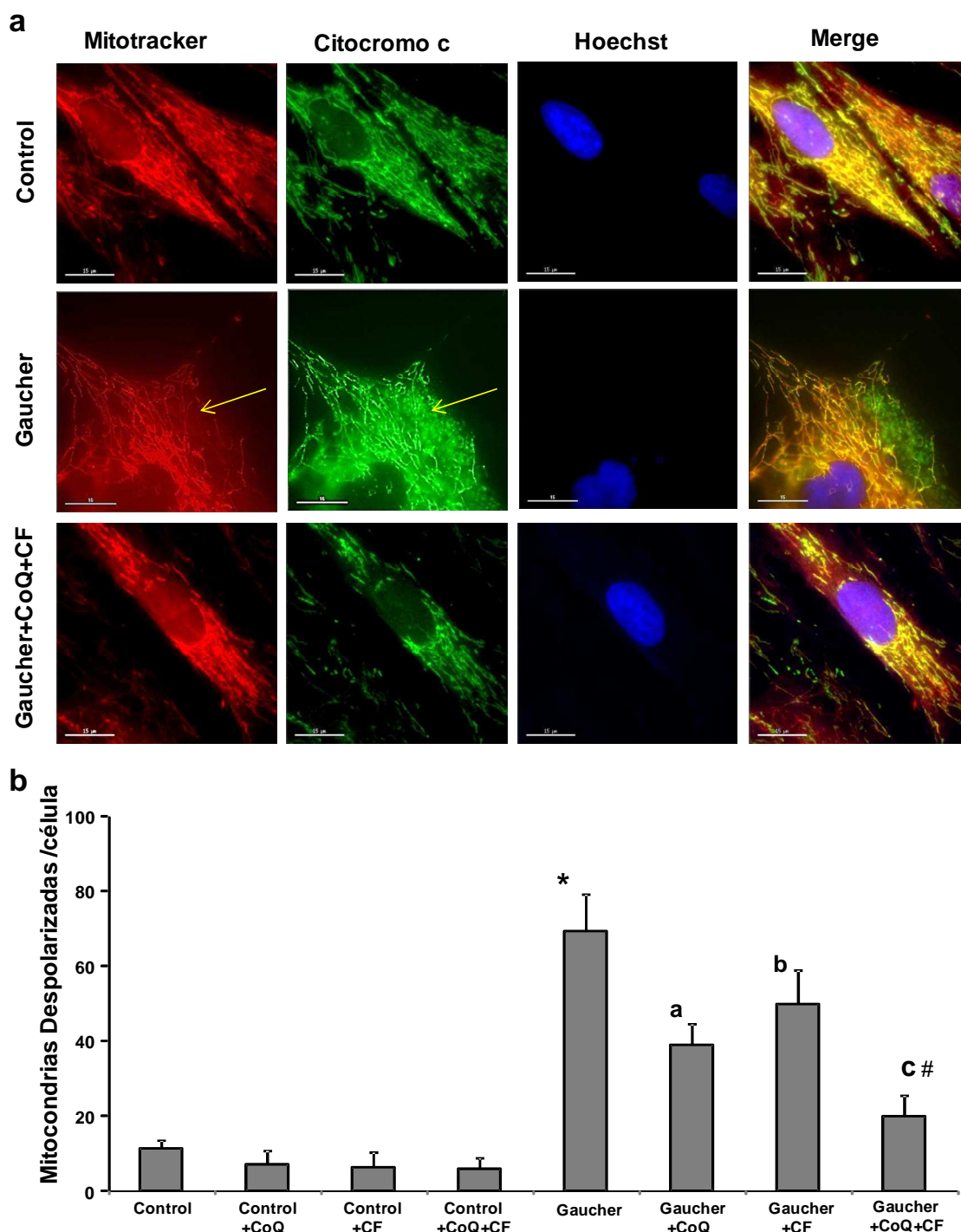


Figura 39 .El tratamiento con CoQ y NAdBT-AIJ restaura la red mitocondrial tubular en fibroblastos de pacientes Gaucher. (a) Análisis por imágenes de fluorescencia del potencial de membrana mitocondrial mediante el uso de MitoTracker Red y Citocromo c .imágenes representativas de los fibroblastos control y de los fibroblastos Gaucher sin tratar y tratados con el tratamiento combinado (25 μ M CoQ+25 μ M CF). Las flechas amarillas indican las mitocondrias pequeñas y despolarizadas. **(b)** Cuantificación de las mitocondrias pequeñas y despolarizadas en fibroblastos Gaucher. La cuantificación de mitocondrias despolarizadas se realizó por análisis de imágenes de fluorescencia en 100 células tomadas al azar de los cultivos de fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes.* p <0,01 entre fibroblastos control y Fibroblastos Gaucher. ap <0,05 entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ. bp <0,05 entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CF. cp <0,05 entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF. $^#p$ <0,05 entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF y tratamiento con CoQ o CF.

6.8.4 Efecto de la inhibición de la β -glucocerebrosidasa y la adición exógena de glucosilceramida sobre la función mitocondrial.

Para comprobar si la acumulación de GlcCer que es típica de la enfermedad de Gaucher era la responsable de la afectación mitocondrial, realizamos un ensayo por microscopía de fluorescencia con la sonda MitoTracker Red CMXRos y marcando la GlcCer con un anticuerpo unido a un fluoróforo que emite en verde. Para aumentar la acumulación de GlcCer en las células, estas fueron tratadas con CBE para inhibir la actividad enzimática de la GCasa y realizamos adición exógena de GlcCer. Los resultados mostraron que la acumulación de GlcCer en las mitocondrias (Figuras 40a y 40b) estaba asociada a una reducción de forma significativa del $\Delta\Psi_m$ (Figuras 40a y 40c), tanto en los fibroblastos controles como Gaucher. Los niveles de GlcCer en los cultivos celulares se correlacionaban con la reducción del $\Delta\Psi_m$. Estos resultados sugieren que el efecto de la GlcCer se extiende más allá del compartimento lisosomal y pueden afectar a otros orgánulos como las mitocondrias.

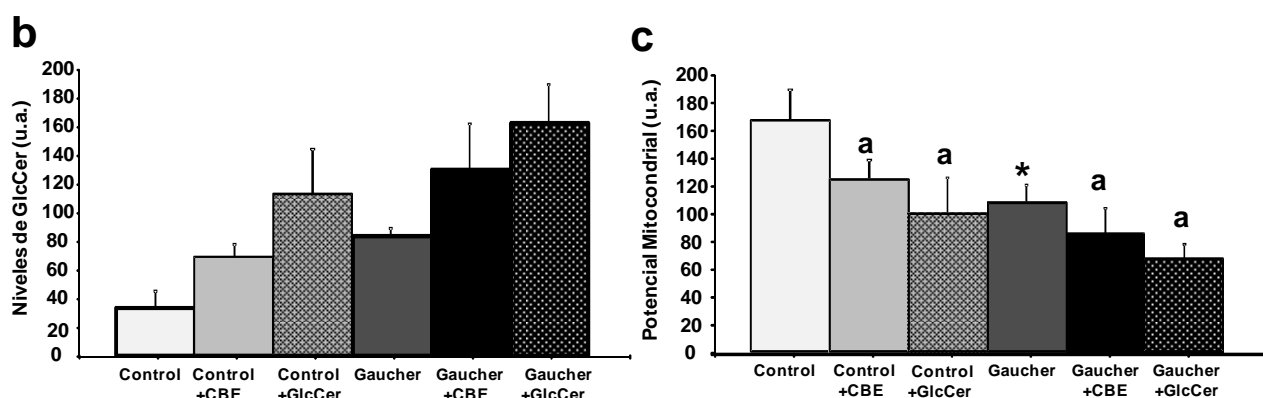
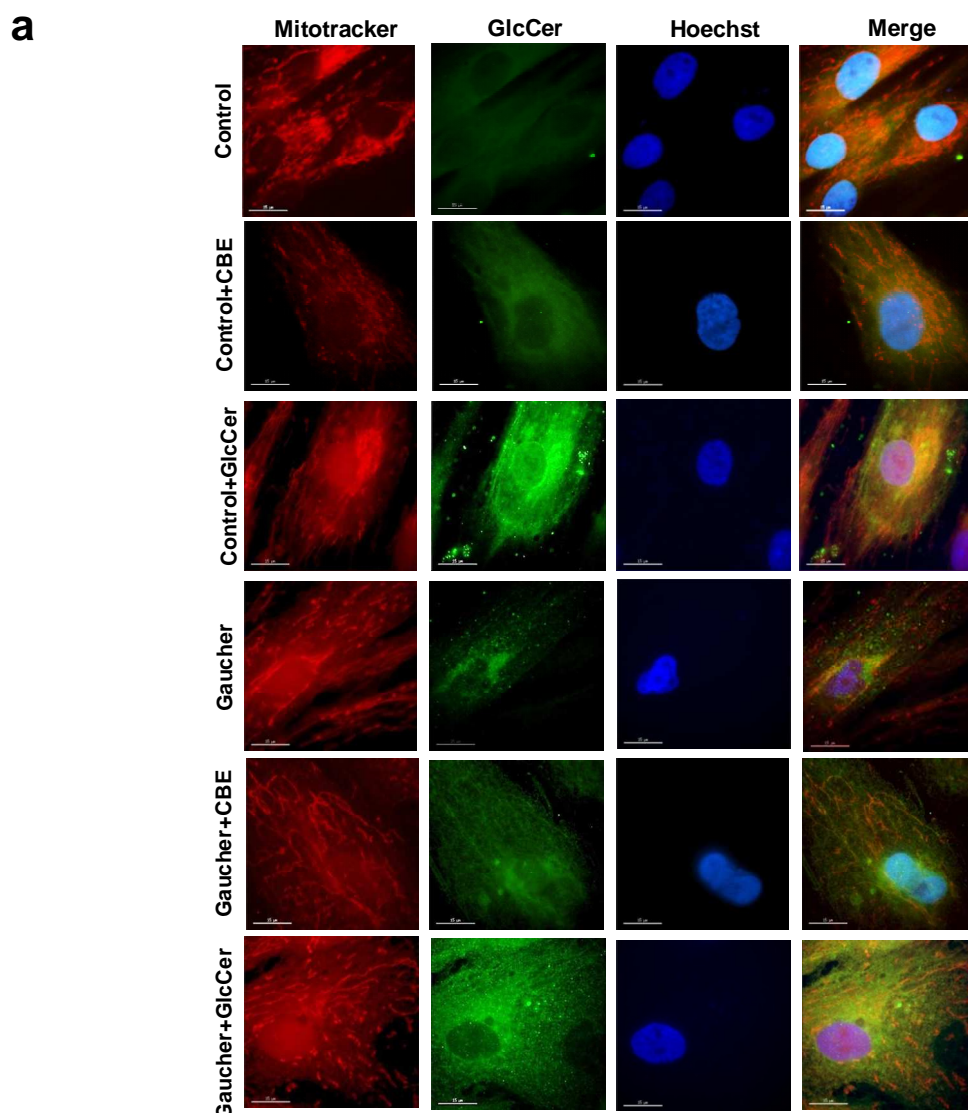


Figura 40. **Efecto de la acumulación de GlcCer sobre la función mitocondrial en fibroblastos Gaucher.** **(a)** Imágenes representativas mediante el uso de MitoTracker Red CMXRos y anti-GlcCer en fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. Escala barra=15 micras. **(b)** Cuantificación de los niveles de GlcCer mediante el análisis de imágenes, de los fibroblastos control y de los fibroblastos Gaucher sin tratar y tratados con el inhibidor conduritol beta epóxido a una concentración de 2,5 mM o la adición exógena de GlcCer a una concentración de 200 μ M durante 24 horas. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. **(c)** Cuantificación del potencial de membrana mitocondrial mediante el análisis de imágenes, de los fibroblastos control y de los fibroblastos Gaucher sin tratar y tratados con el inhibidor conduritol beta epóxido a una concentración de 2,5 mM o la adición exógena de GlcCer a una concentración de 200 μ M durante 24 horas. La cuantificación de mitocondrias individuales despolarizadas se realizó por análisis de imágenes de fluorescencia en 100 células tomadas al azar de los cultivos de fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,01$ entre fibroblastos control v Fibroblastos Gaucher. ^a $p < 0,01$ entre la presencia v la ausencia de tratamiento con CBE o GlcCer.

6.8.5 Efecto del tratamiento con coenzima Q_{10} y NAdBT-AIJ sobre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Demostrada la existencia de una alteración mitocondrial en los fibroblastos de pacientes Gaucher con la mutación L444P/L444PS, se examinaron los niveles del O_2^- mitocondrial y el H_2O_2 en las tres líneas celulares Gaucher. La producción basal de O_2^- y H_2O_2 resultó significativamente mayor en los fibroblastos Gaucher comparadas con los fibroblastos control. Los niveles del O_2^- fueron determinados con la sonda MitoSOX™. También determinamos la masa mitocondrial utilizando la sonda fluorescente 10-N-nonil naranja de acridina (NAO) que se une específicamente a la cardiolipina presente en la membrana interna mitocondrial, independientemente del potencial de membrana mitocondrial. De esta forma pudimos marcar de manera específica las mitocondrias y así poder referir las medidas de ROS a la masa mitocondrial al calcular el ratio MitoSOX™/ NAO. Los resultados obtenidos mostraron un incremento en la producción de ROS mitocondriales en los fibroblastos Gaucher de 2,5 veces comparada con los controles (Figura 41a).

A continuación, medimos los niveles de H_2O_2 tiñendo las células con la sonda 2', 7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína, acetil éster (CMH₂DCFDA), que se difunde a través de las membranas y se oxida por el H_2O_2 a diclorofluoresceína (DCF), un fluorescente verde. La producción de H_2O_2 en los fibroblastos Gaucher estaba incrementada 2 veces comparada con los controles (Figura 41b). Estos ensayos se realizaron mediante citometría de flujo.

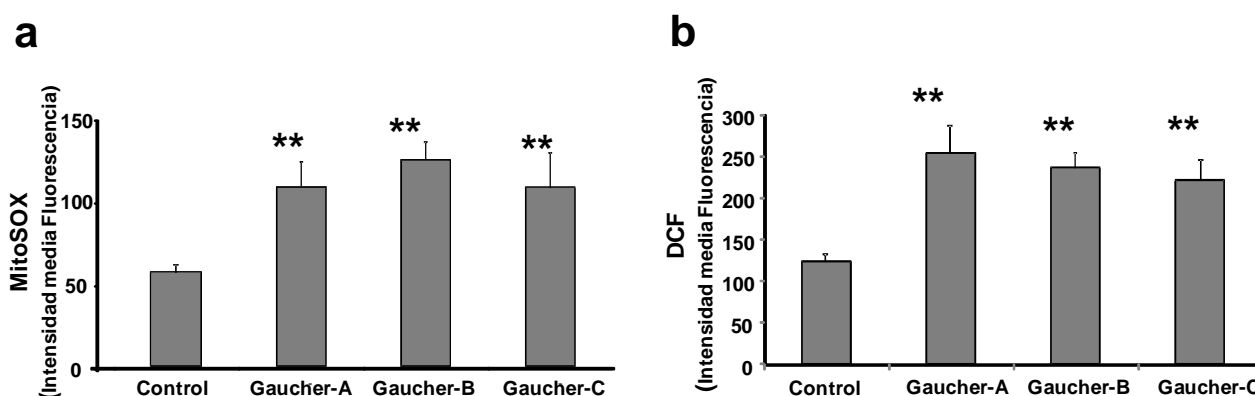


Figura 41. **Producción de ROS en fibroblastos Gaucher. ROS mitocondrial usando el marcador MitoSOX y CMH₂DCFDA para evaluar el H₂O₂.** (a) Niveles de ROS mitocondrial en fibroblastos control y 3 fibroblastos Gaucher portadores de la mutación L444P/L444P. Los resultados se expresan como la relación de señal de MitoSOX/10-N-nonil naranja de acridina (NAO). (b) Niveles de H₂O₂ en fibroblastos control y 3 fibroblastos Gaucher portadores de la mutación L444P/L444P. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. ** $p < 0.01$ entre fibroblastos control v Fibroblastos Gaucher.

El tratamiento de los cultivos celulares con CoQ, NAdBT-AIJ y especialmente el tratamiento combinado CoQ+NAdBT-AIJ redujo los niveles de superóxido mitocondrial y de H₂O₂ en los fibroblastos derivados de pacientes Gaucher, sin tener ningún efecto en los cultivos de fibroblastos control (Figuras 42a y 42b).

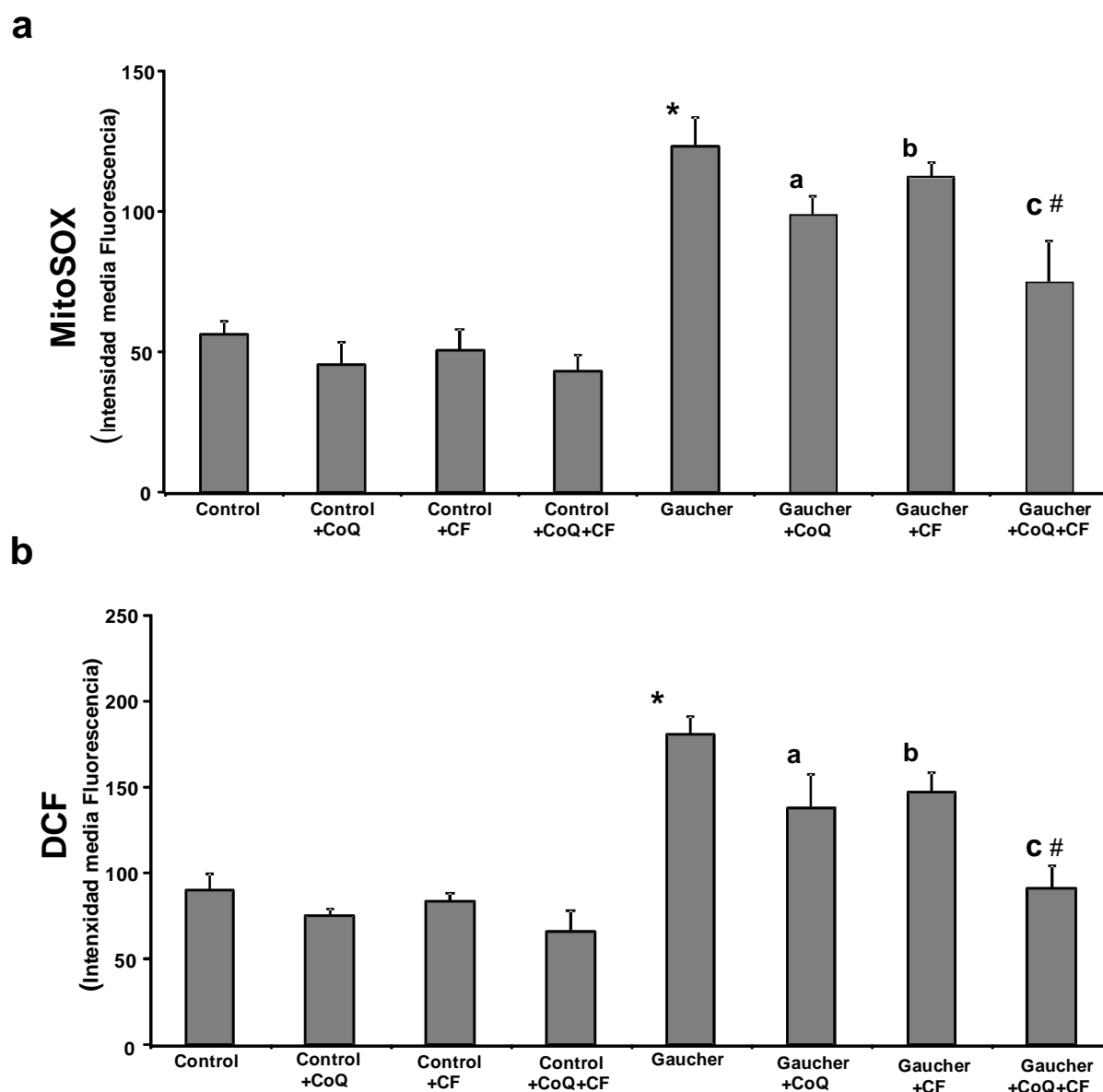


Figura 42. **Efecto de la CoQ y NAdBT-AIJ sobre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en fibroblastos Gaucher. ROS mitocondrial usando el marcador MitoSOX y CMH₂DCFDA para evaluar el H₂O₂.** (a) Niveles de ROS mitocondrial en fibroblastos control y fibroblastos Gaucher portadores de la mutación L444P/L444P tras los tratamientos individuales con CoQ, CF y el tratamiento combinado CoQ+CF. Los resultados se expresan como la relación de señal de MitoSOX/10-N-nonil naranja de acridina(NAO). (b) Niveles de H₂O₂ en fibroblastos control y 3 fibroblastos Gaucher portadores de la mutación L444P/L444P tras los tratamientos individuales con CoQ, CF y el tratamiento combinado CoQ+CF. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y Fibroblastos Gaucher. ^a $p < 0.05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ. ^b $p < 0.05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con PC. ^c $p < 0.05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF. [#] $p < 0.05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF y CoQ o CF.

La eficacia del tratamiento combinado CoQ+NAdBT-AIJ sobre los niveles de ROS y de H_2O_2 fue confirmada en las tres líneas de fibroblastos Gaucher L444P/L444P (Figuras 43a y 43 b).

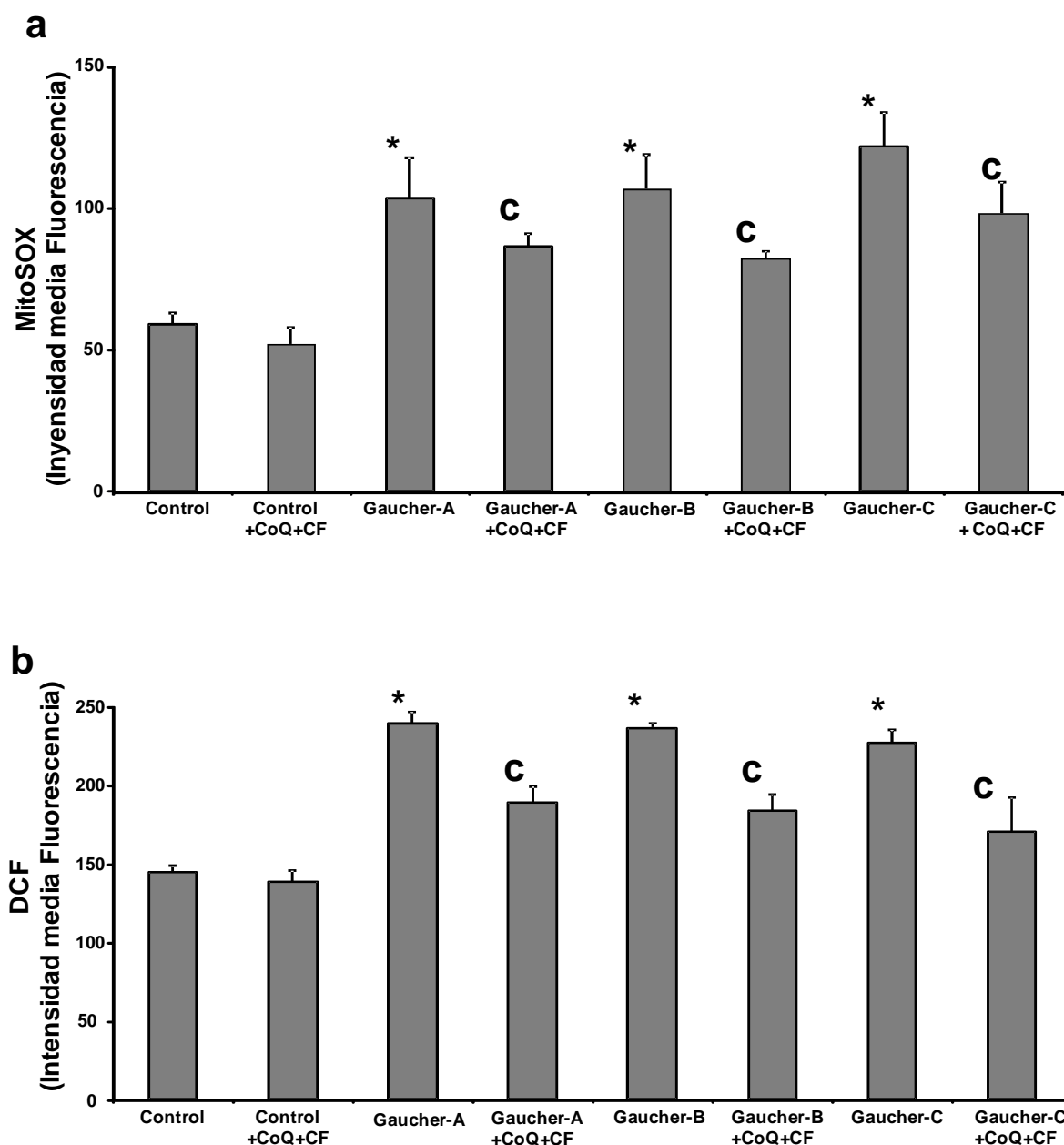


Figura 43. El tratamiento combinado de CoQ+NAdBT-AIJ reduce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en 3 líneas celulares de fibroblastos Gaucher. (a) Niveles de ROS mitocondrial en fibroblastos control y fibroblastos Gaucher portadores de la mutación L444P/L444P tras el tratamiento combinado CoQ+CF. **(b)** Niveles de H_2O_2 en fibroblastos control y 3 fibroblastos Gaucher portadores de la mutación L444P/L444P tras el tratamiento combinado CoQ+CF. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. $\varphi < 0.05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF.

6.9 Autofagia en fibroblastos derivados de pacientes con la enfermedad de Gaucher

Para comprobar que la activación de la autofagia en los fibroblastos Gaucher estaba asociada a un aumento en la producción de ROS mitocondriales, analizamos la expresión de distintos marcadores que participan en la autofagia. Para ello, determinamos si la autofagia estaba incrementada en los fibroblastos Gaucher (Gaucher-A, Gaucher-B y Gaucher-C). Realizamos una cuantificación de las vacuolas ácidas, mediante una tinción con la sonda LysoTracker red DND-99, para ello realizamos un análisis por microscopia de fluorescencia y citometría de flujo (Figuras 44a y 44b). Los resultados obtenidos muestran un incremento en el número de vacuolas ácidas en los fibroblastos de pacientes Gaucher de 1,4 veces comparado con los fibroblastos controles.

Para dilucidar si la autofagia en fibroblastos Gaucher puede ser atenuada mediante el tratamiento con CoQ y por la administración de la CF NAdBT-AIJ. Se cuantificaron las vacuolas ácidas, con la sonda LysoTracker red DND-99 mediante citometría de flujo, expresando los valores como la media de la fluorescencia observada. El tratamiento de los cultivos celulares con CoQ, CF y especialmente el tratamiento combinado CoQ+CF indujo una reducción en la intensidad de la tinción con LysoTracker en los fibroblastos Gaucher, sin tener ningún efecto en los cultivos de fibroblastos control (Figura 44c).

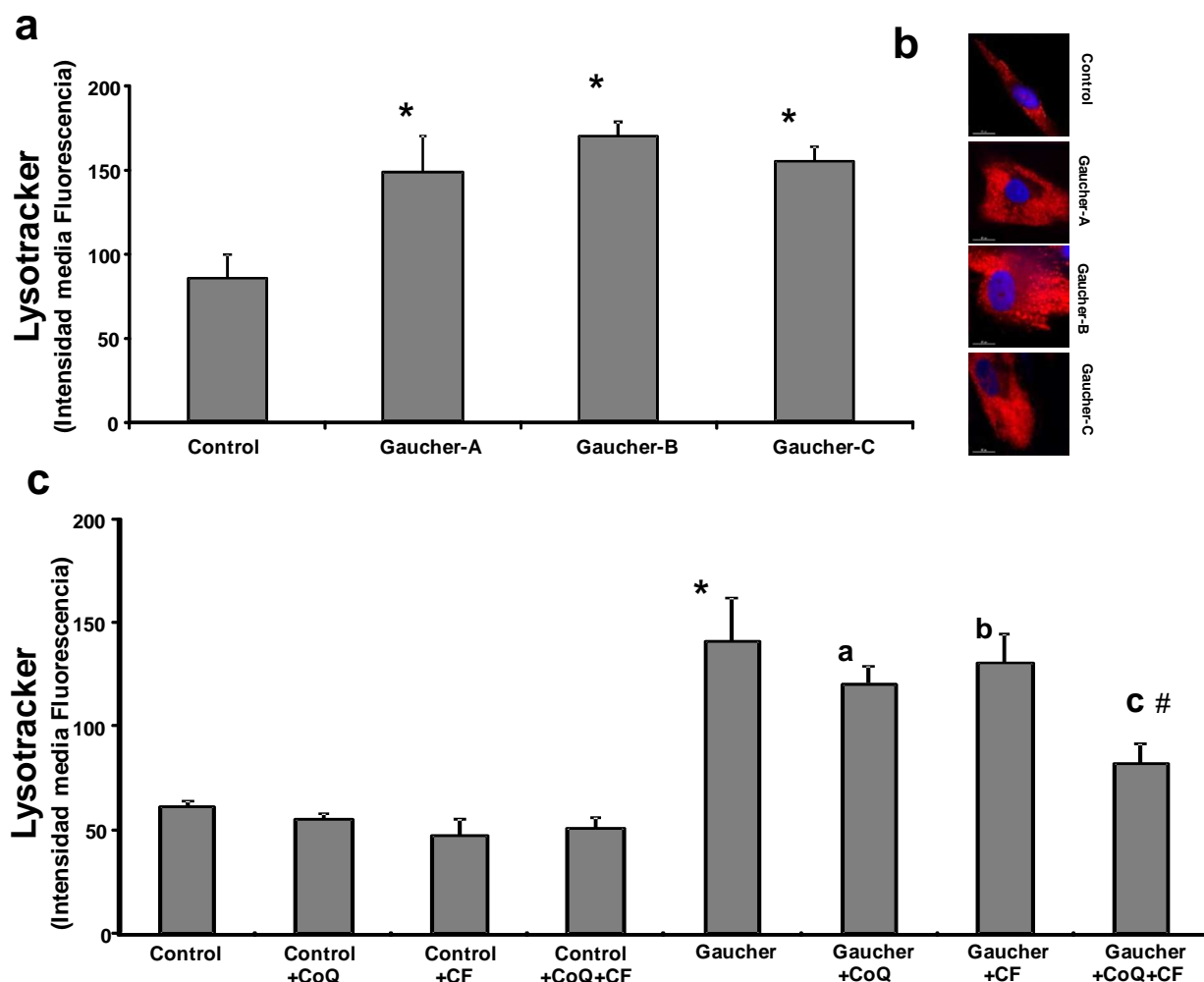


Figura 44. **Incremento del número de vacuolas ácidas en fibroblastos de pacientes Gaucher.** (a) Cuantificación de vacuolas ácidas en tres líneas de fibroblastos Gaucher portadores de la mutación L444P/L444P (Gaucher-A, Gaucher-B y Gaucher-C), con la sonda LysoTracker red DND-99 mediante citometría de flujo. (b) Imágenes representativas de en fibroblastos control y fibroblastos Gaucher portadores de la mutación L444P/L444P teñidos con LysoTracker red DND-99. (c) Cuantificación de vacuolas ácidas en fibroblastos control y fibroblastos Gaucher portadores de la mutación L444P/L444P tras los tratamientos individuales con CoQ, CF y el tratamiento combinado CoQ+CF, mediante citometría de flujo. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,01$ entre fibroblastos control y Fibroblastos Gaucher. ^a $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ. ^b $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con PC. ^c $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF. # $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF y CoQ o CF.

La eficacia del tratamiento combinado CoQ+CF sobre la reducción del número de vacuolas ácidas, se confirmó en las tres líneas de fibroblastos Gaucher L444P/L444P (Gaucher-A, Gaucher-B y Gaucher-C). La cuantificación fue llevada a cabo mediante citometría de flujo con la sonda LysoTracker. Las imágenes de fluorescencia con la tinción con LysoTracker, confirmaron la reducción de la intensidad de la tinción en los fibroblastos derivados de pacientes Gaucher tratados con CoQ+CF (Figuras 45a y 45b).

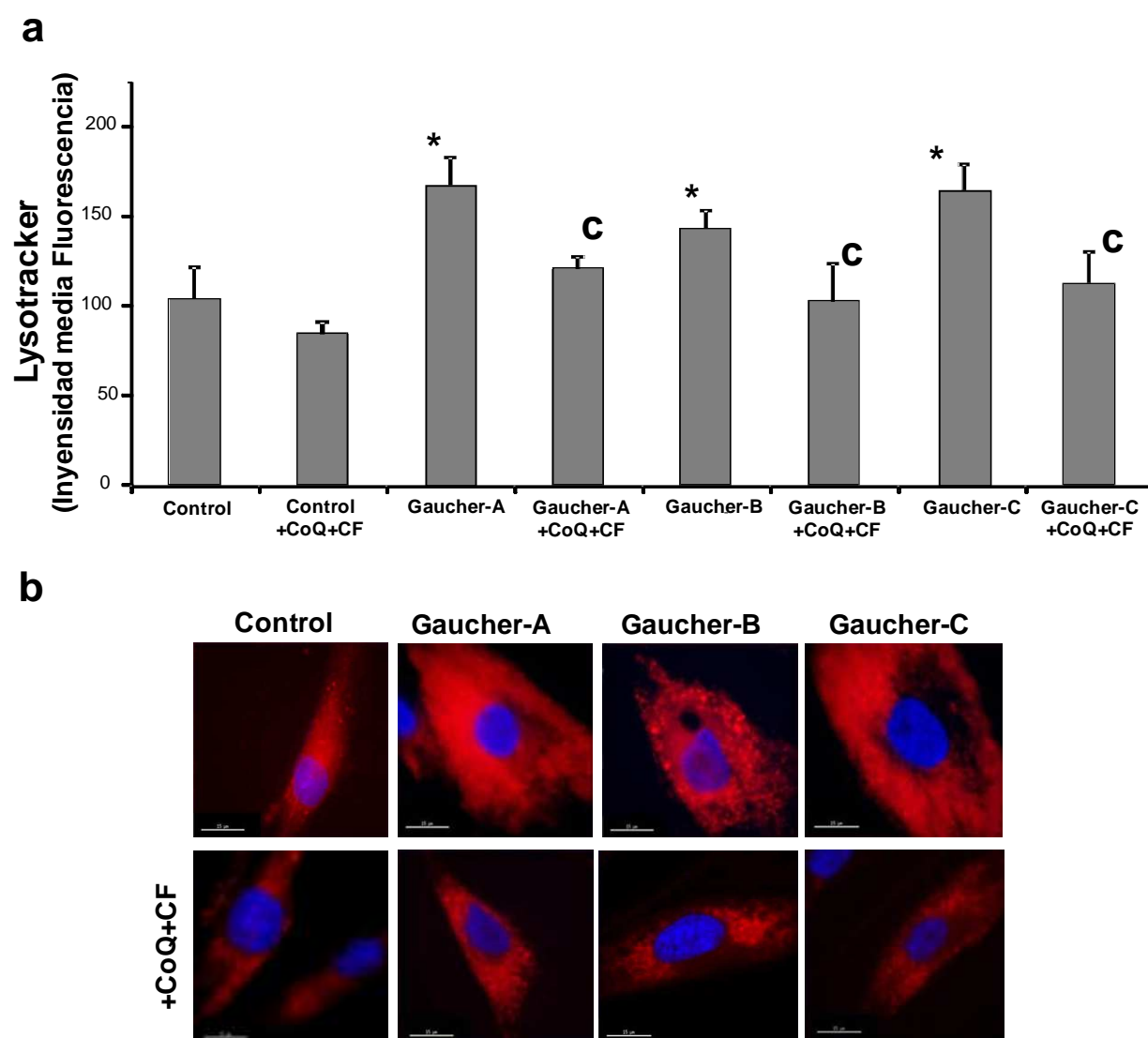


Figura 45. **La combinación de CoQ y NAdBT-AIJ reduce el número de vacuolas ácidas en fibroblastos de pacientes Gaucher.** (a) Cuantificación del número de vacuolas ácidas mediante citometría de flujo usando la sonda LysoTracker red DND-99. (b) Imágenes representativas de fibroblastos control y fibroblastos Gaucher teñidos con LysoTracker red DND-99 que muestran como el tratamiento combinado CoQ y NAdBT-AIJ reduce la intensidad de la tinción. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y Fibroblastos Gaucher. ^c $p < 0.05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con

Durante el inicio de la autofagia la proteína citosólica LC3 es procesada para formar LC3-II, que es luego reclutada a la membrana del autofagosoma, los cuales aparecen como partículas discretas que pueden ser detectadas por microscopia de fluorescencia y cuyos niveles pueden ser monitorizados mediante Western Blotting. Con el fin de verificar la activación de la autofagia en los fibroblastos Gaucher, examinamos la expresión de proteínas autofágicas y lisosomales mediante Western-Blotting. Los resultados mostraron que la ratio de la forma LC3-II respecto a la forma citosólica LC3-I, fue significativamente mayor en los fibroblastos Gaucher lo que indica un incremento en la formación y/o acumulación de autofagosomas en los fibroblastos patológicos. Otro sistema necesario para las etapas iniciales de formación del autofagosoma es un sistema de conjugación tipo ubiquitina (Ub) formado por la proteína ATG12, que forma complejo con la proteína ATG5, este complejo también presentó mayores niveles de expresión en los fibroblastos Gaucher comparados con los fibroblastos Control. Igualmente, los niveles de expresión de BECLIN1, otra proteína iniciadora en la formación del autofagosoma, estaba ligeramente incrementada comparada con los fibroblastos control.

Igualmente, estudiamos la activación de la autofagia en los fibroblastos Gaucher mediante el examen de los niveles de expresión de la enzima lisosomal Catepsina D, comparada con los cultivos de fibroblastos control, encontrando un aumento significativo en los niveles de expresión de catepsina D en los fibroblastos Gaucher. La expresión de la proteína actina fue utilizada como control de carga en estos ensayos y fue similar en fibroblastos Gaucher y fibroblastos control (Figura 46a). El tratamiento de los cultivos celulares con CoQ y NAdBT-AIJ, redujo parcialmente los niveles de expresión de las proteínas autofágicas y la enzima lisosomal catepsina D. El tratamiento conjunto CoQ + NAdBT-AIJ, fue muy eficaz y restauró los niveles de expresión de las proteínas autofágicas y la catepsina D a niveles cercanos al que presentaban los fibroblastos control. El análisis densitométrico de las proteínas autofágicas y la catepsina D se muestra en la Figura 46

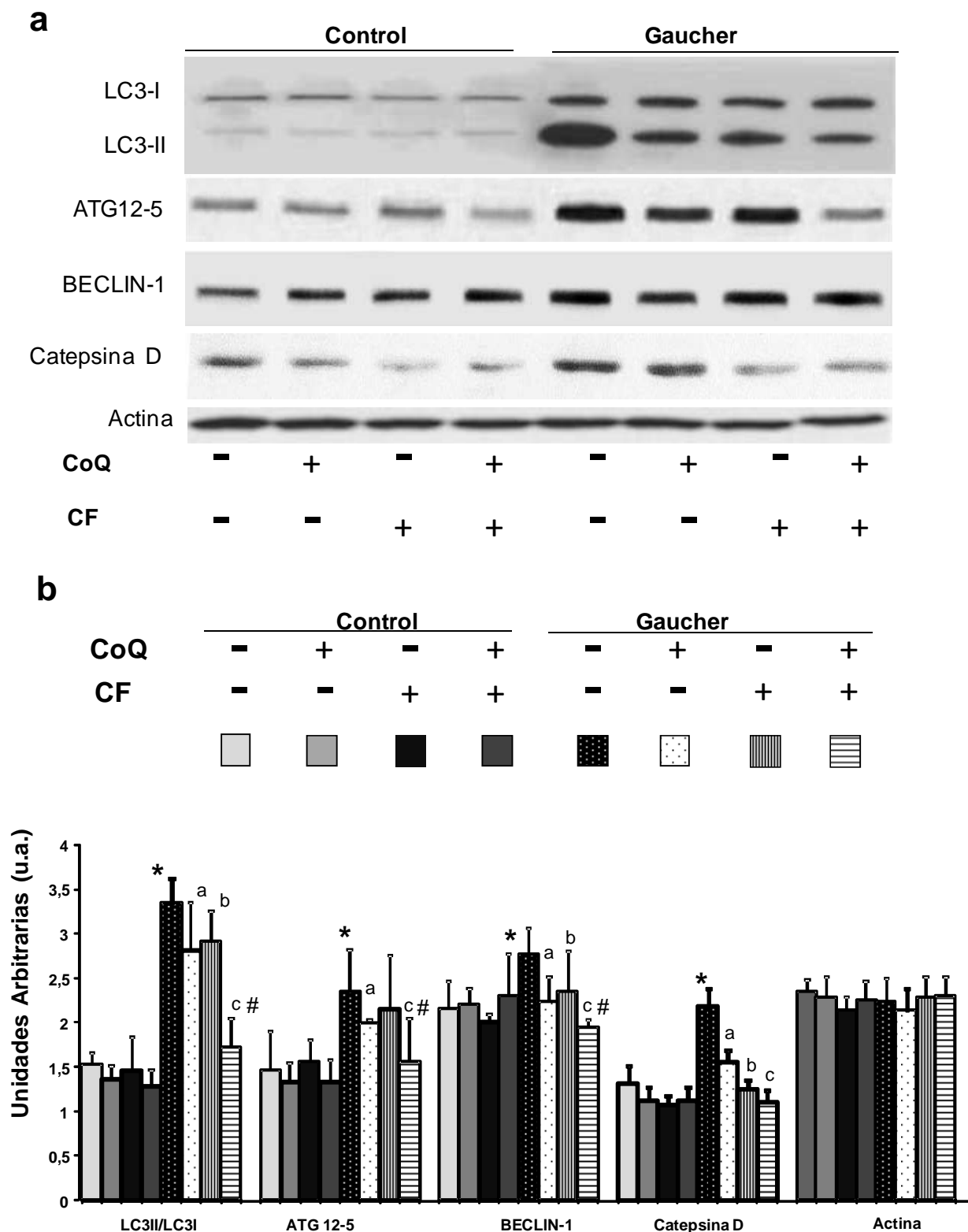


Figura 46. **Incremento de marcadores autofágicos en los fibroblastos de pacientes Gaucher.** (a) Expresión de los niveles de proteínas autofágicas. Proteína LC3-I (banda superior) y LC3-II (banda inferior) ATG12-ATG5, BECLIN1 y Catepsina D medida por Western blotting. La expresión de la proteína Actina fue usada como control de carga. (b) Densitometría de la expresión de proteínas autofágicas realizadas por Western-Blotting con el software ImageJ. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes.* $p < 0,01$ entre fibroblastos control y Fibroblastos Gaucher. ^a $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ.^b $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con PC.^c $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF. # $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF y CoQ o CF.

6.9.1 Efecto del tratamiento con coenzima Q_{10} y NAdBT-AIJ sobre la degradación selectiva de mitocondrias por autofagia.

Para confirmar la degradación selectiva de mitocondrias, realizamos ensayos de microscopía de inmunofluorescencia con marcadores mitocondriales (Citocromo c) en verde y autofágicos como el LC3 en rojo. El citocromo c es una proteína transportadora de electrones que reside en el espacio intermembrana de la mitocondria, lo que la convierte en un buen marcador mitocondrial. La tinción con LC3 era apenas detectable en los fibroblastos control, mientras que en los fibroblastos Gaucher, las mitocondrias de forma alargada y tubular eran negativas para LC3, también mostraban pequeñas mitocondrias aisladas y fragmentadas positivas para LC3 (Figura 47a). En una mayor ampliación de una imagen de un fibroblasto Gaucher (figura 47b), la doble inmunotinción con los marcadores mostró colocalización entre el marcador mitocondrial citocromo c y el marcador autofágico específico, la proteína LC3. La imagen muestra una red de mitocondrias tubulares, que eran negativas para LC3 (colocalización $r = -0.0526$), La flecha roja indica las mitocondrias tubulares donde no existe colocalización y la flecha amarilla indica puntos de colocalización entre ambos marcadores, mostrando la colocación de marcadores mitocondriales y del autofagosoma mitocondrias. La imagen del fibroblasto Gaucher, nos muestra, que junto a las mitocondrias tubulares aparecen gran cantidad de mitocondrias pequeñas y fragmentadas, que eran positivas para LC3 (colocalización, $r = 0.8929$), lo que indica la presencia de mitofagia (Figura 47b). Además, cuantificamos los puntos de colocalización LC3/Citocromo c, en los fibroblastos control y fibroblastos Gaucher y los tratamientos individuales con CoQ, NAdBT-AIJ y el tratamiento combinado CoQ + NAdBT-AIJ. Los resultados indicaron que el tratamiento combinado CoQ + NAdBT-AIJ era significativamente el más efectivo en reducir los puntos de colocalización LC3/Citocromo c en los fibroblastos Gaucher (Figura 47c).

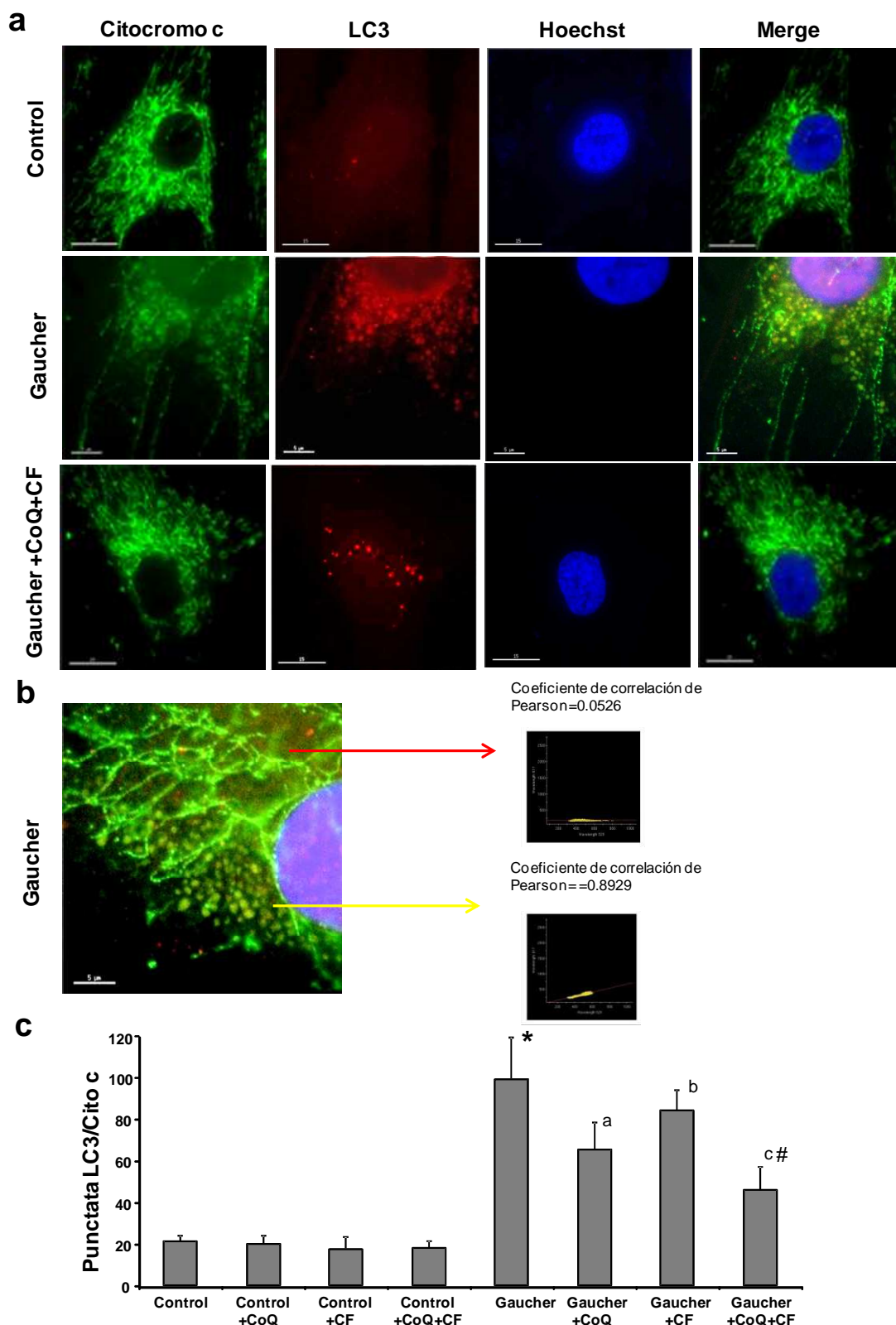


Figura 47. **Colocalización de autofagosomas y marcadores mitocondriales en fibroblastos de pacientes Gaucher.** (a) Imágenes de fluorescencia mediante el uso de LC3 como marcador de autofagosomas y Citocromo c como marcador mitocondrial de los fibroblastos control y de los fibroblastos Gaucher sin tratar y tratados con el tratamiento conjunto (25 μ M CoQ+25 μ M CF). (b) Ampliación de un área de la imagen de un fibroblasto Gaucher, las flechas indican los puntos de colocalización entre ambos marcadores. (c) Cuantificación de puntos de colocalización LC3/Citocromo c en los fibroblastos derivados de pacientes Gaucher. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,01$ entre fibroblastos control y Fibroblastos Gaucher. ^a $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ. ^b $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con PC. ^c $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF. [#] $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF y CoQ o CF.

6.9.2 Confirmación de la selectividad autofágica de mitocondrias disfuncionales por mitofagia.

Para llevar a cabo la confirmación de la activación de la mitofagia en fibroblastos derivados de pacientes Gaucher, realizamos ensayos por Western Blotting donde analizamos el estado de diferentes compartimentos celulares mediante la observación de niveles de expresión de proteínas específicas de dichos orgánulos. Las proteínas marcadoras elegidas fueron para los niveles de expresión mitocondrial fueron, Porina, Complejo I (subunidad 30 kDa), Complejo III (subunidad core1), los cuales estaban disminuidos significativamente comparados con los fibroblastos control y como marcadores para los distintos orgánulos celulares fueron, Retículo endoplasmático (PDI), Aparato de Golgi (Golgi Marker), Peroxisomas (catalasa), los niveles de expresión de estas proteínas no se vieron afectados comparados con los fibroblastos control. Como control de carga se utilizó α -Tubulina.

El tratamiento con CoQ aumentó los niveles de expresión de las proteínas mitocondriales, sin producir ningún efecto en los demás marcadores para los distintos orgánulos celulares (Figura 48a y 48b) .

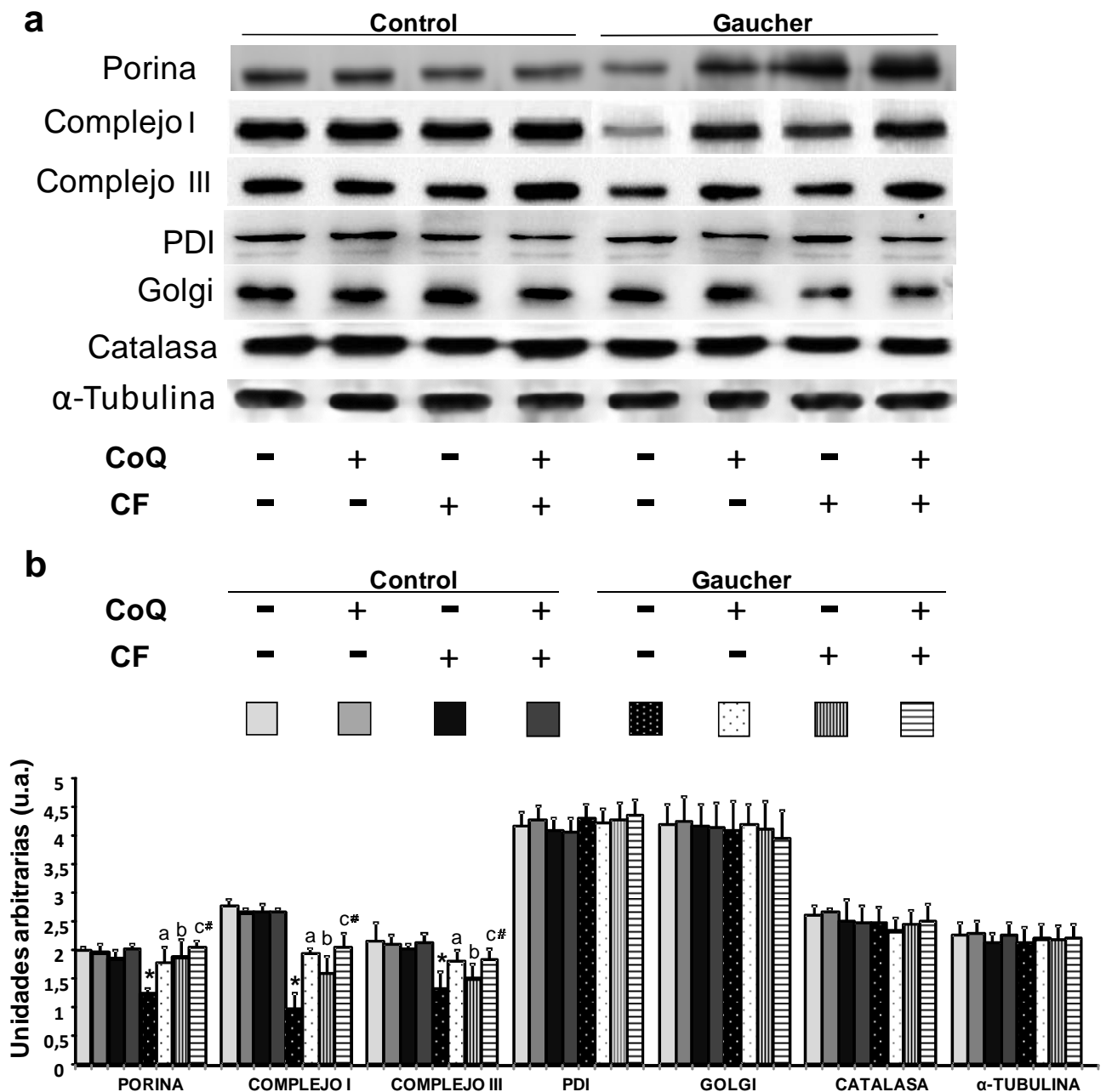


Figura 48. **Mitofagia en fibroblastos derivados de pacientes con la enfermedad de Gaucher.** (a) Expresión de los niveles de proteínas de diferentes orgánulos medida por Western blotting como se describe en el apartado “Material y Métodos”. Proteínas mitocondriales (Porina, Complejo I (subunidad 30 kDa) y Complejo III (subunidad core 1), proteínas específicas del Retículo endoplasmático (PDI), marcadores de Golgi (Golgi Marker) y peroxisomas (Catalasa). La expresión de α -Tubulina fue usada como control de carga. (b) Densitometría de la expresión de proteínas de los distintos orgánulos realizadas por Western-Blotting con el software ImageJ. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,01$ entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. ^a $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,01$ entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. ^a $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ. ^b $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CF. ^c $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF. [#] $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF y CoQ o CF.

6.9.3 Estudio del flujo autofágico lisosomal.

El proceso de autofagia transcurre a través de un flujo mediado por la interacción de multitud de complejos proteicos y lípidos que finaliza con la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma donde el material es degradado por las enzimas lisosomales. Este flujo autofágico puede ser bloqueado con el uso de Bafilomicina A1 (Baf), un inhibidor de la H^{+} ATPasa vacuolar [217]. Este compuesto se caracteriza por inhibir la degradación del contenido lisosomal mediante la inhabilitación de la bomba H^{+} ATPasa en las vacuolas lisosomales, incrementando su pH, inactivando las proteasas lisosomales ácidas e impidiendo la fusión lisosoma-autofagosoma. Los cultivos de fibroblastos fueron incubados a 37°C con el tratamiento de esta droga a una concentración de 100 nM durante un periodo de tiempo estimado de 12 horas, durante las cuales se paraliza todo el flujo autofágico lisosomal. A continuación, analizamos la cantidad de proteína autofágica LC3 en su forma activa por Western Blotting. En presencia de esta droga, la acumulación de autofagosomas positivos para LC3-II evidencia un flujo autofágico eficiente mientras que un menor incremento de esta proteína indica un defecto o bloqueo en este proceso.

El resultado del tratamiento y el ensayo western-Blotting de la proteína LC3-II, sobre fibroblastos control produce un aumento en la acumulación de LC3-II indicando que el flujo autofágico es normal. Sin embargo, esto no es apreciable en los fibroblastos Gaucher, en los que no se observa ningún incremento de la proteína autofágica LC3 en su forma activa. Este ensayo sugiere la existencia de alguna alteración del flujo autofágico en las células patológicas. También se comprobó si los niveles de proteínas mitocondriales se veían afectados por la inhibición del flujo autofágico con el uso de bafilomicina A1 [218], induciendo un aumento en los niveles de la Porina y el Citocromo c en los fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Gaucher, pero no en fibroblastos control. Lo que nos sugiere una mayor degradación mitocondrial dentro de los autofagolisosomas en las células patológicas. En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que tanto la activación de la mitofagia y el deterioro del flujo autofágico coexisten en los fibroblastos Gaucher (Figuras 43a y 43b).

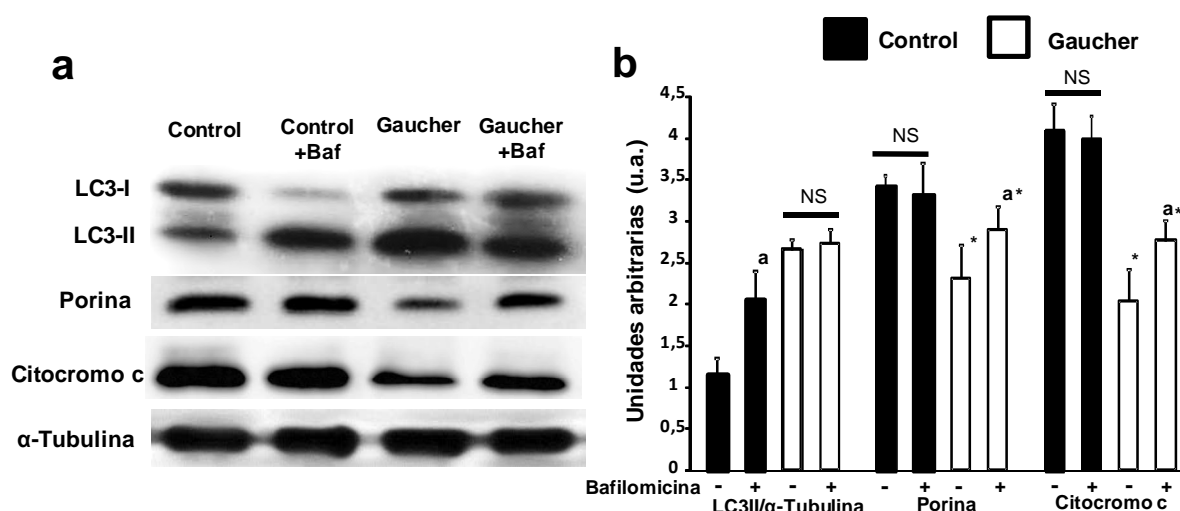


Figura 49. **Alteración del flujo autofágico en fibroblastos derivados de pacientes Gaucher.** (a) Determinación de la expresión de la proteína autofágica LC3-II y los niveles de la proteínas mitocondriales porina y Citocromo c, en presencia y ausencia de Bafilomicina A1 (Baf) en los fibroblastos control y fibroblastos Gaucher-B. Las células se incubaron con Bafilomicina A1 (100 nM durante 12 h). Extractos celulares totales se analizaron por Western-Blotting con anticuerpos contra LC3, porina y Citocromo c. La proteína α -tubulina se utilizó como control de carga. (b) Densitometría de la expresión de proteínas por Western-Blotting con el software ImageJ. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos separados. * $p < 0,01$ entre el control y los fibroblastos de Gaucher. ^a $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de bafilomicina A1. (NS= no significativo) Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,01$ entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher. ^a $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de bafilomicina.

6.9.4 La autofagia ejerce un mecanismo protector en la enfermedad de Gaucher.

Para verificar el papel protector de la autofagia en la supervivencia de las células deficientes de GBA, se examinó la apoptosis en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) silvestres y “noqueados” para ATG5 (ATG5^{-/-}). La elección de trabajar con fibroblastos embrionarios de ratón “noqueados” para ATG5, una proteína implicada en el proceso de formación de autofagosomas, provoca en estas células que no puedan realizar autofagia. Provocamos una inactivación parcial de la actividad enzimática de GCasa en los dos tipos celulares: silvestre y “noqueados” para ATG5 mediante tratamiento con Conduritol β epóxido (CBE) un inhibidor específico e irreversible de la GCasa. A continuación, cuantificamos la apoptosis en ambos tipos celulares. La apoptosis fue cuantificada mediante la visualización de la fragmentación o condensación de los núcleos, mediante la tinción con Hoechst, la activación de las caspasas, la liberación de Citocromo c.

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) de tipo silvestre presentaron menor porcentaje de apoptosis, en cambio los fibroblastos “noqueados” para ATG5, fueron significativamente más sensibles a la inducción de la deficiencia de GCasa activa, con un aumento porcentual de un 15% en la apoptosis comparados con los fibroblastos control. El tratamiento con CoenzimaQ₁₀+NAdBT-AIJ de los MEFs tratados con CBE, atenuó significativamente los valores de muerte celular, lo que confirma la especificidad de la inducción de apoptosis por la deficiencia de GCasa (Figuras 50a y 50b).

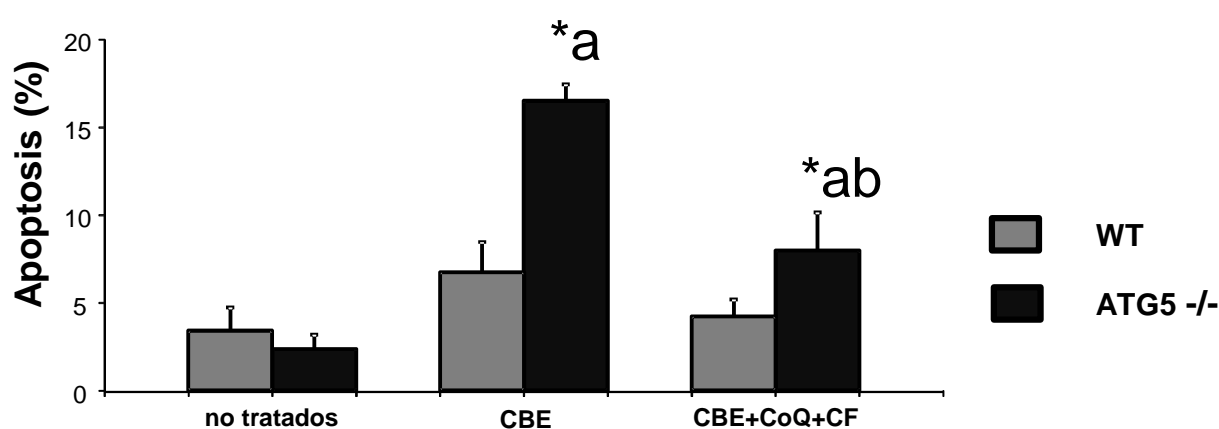


Figura 50. **Incremento de la apoptosis en fibroblastos (ATG5^{-/-}) con deficiencia de actividad GCasa.**

(a) La inactivación de GCasa mediante tratamiento con CBE a una concentración de 2,5mM durante 48 horas. Se analizó y cuantificó la apoptosis tanto en fibroblastos embrionarios de ratón silvestres (competentes en autofagia) y “noqueados” para ATG5 (autofagia deficiente) como se describe en el apartado de “Material y métodos”. **(b)** Cuantificación de la apoptosis en los cultivos celulares MEFs tratados con CBE y CBE+CoQ+CF. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. ^{*}p<0,01 entre fibroblastos de ratón MEFs tipo silvestre (wt) y MEFs “noqueados” Atg5^{-/-}. ^ap<0,05 entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CBE. ^bp<0,05 entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF.

6.10 Efecto de coenzima Q_{10} y NAdBT-AIJ sobre la actividad enzimática de la Glucocerebrosidasa y su tráfico hasta los lisosomas

6.10.1 Determinación de la actividad enzimática de la β -glucocerebrosidasa.

Determinamos la actividad enzimática de la GCase en los fibroblastos de pacientes Gaucher, encontrando que estaba reducida a niveles inferiores al 10% comparado con valores de las células control (Figura 51).

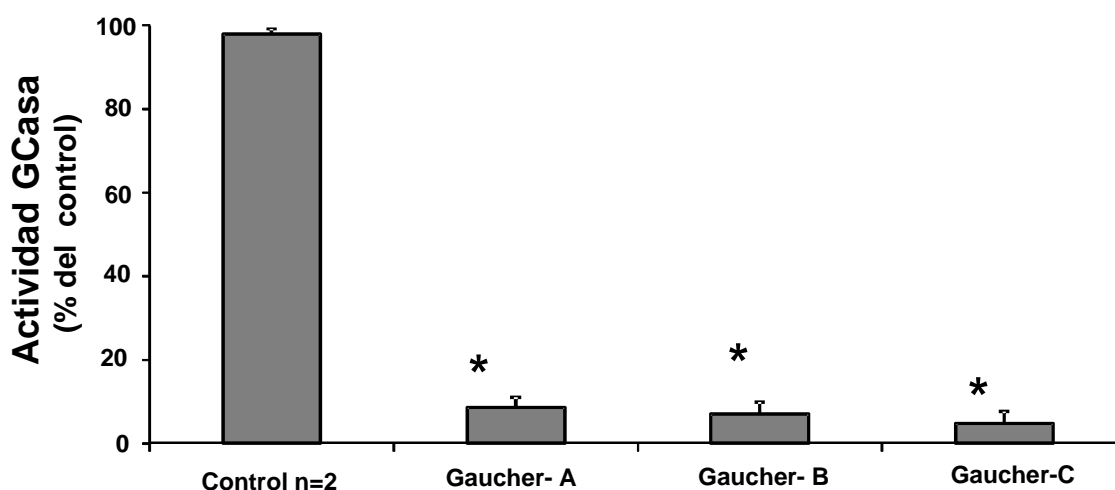


Figura 51. **Actividad enzimática de la GCase en dos líneas de fibroblastos control y tres líneas de fibroblastos Gaucher L444P/L444P (Gaucher-A, Gaucher-B y Gaucher-C).** Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes.* $p < 0,01$ entre fibroblastos control y fibroblastos Gaucher.

6.10.2 Efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ y NAdBT-AIJ sobre la actividad enzimática y la expresión proteica de la glucocerebrosidasa.

Para comprobar el efecto de los tratamientos sobre la actividad enzimática de la Gcasa. La figura 52 nos muestra como la actividad enzimática es parcialmente restaurada tras la mejora de la función mitocondrial por CoQ (1,2 veces) así como por el correcto plegamiento inducido por el tratamiento con chaperonas NAdBT-AIJ (2.4 veces). El tratamiento combinado de ambos compuestos consigue una mayor aumento de los niveles de actividad enzimática de la GCasa (3.4 veces) (Figura 52a). Las deficiencias en la actividad enzimática se asocian a niveles reducidos de la expresión de la proteína GCasa. Al igual que ocurre con la actividad, su expresión aumenta con el tratamiento con CoQ y la CF y especialmente con el tratamiento combinado. En la figura 52b se muestran los niveles de expresión proteica determinados por Western blot. La expresión de α -tubulina es usada como control de carga. En la figura 52c se representa un análisis densitométrico del resultado del Western blot.

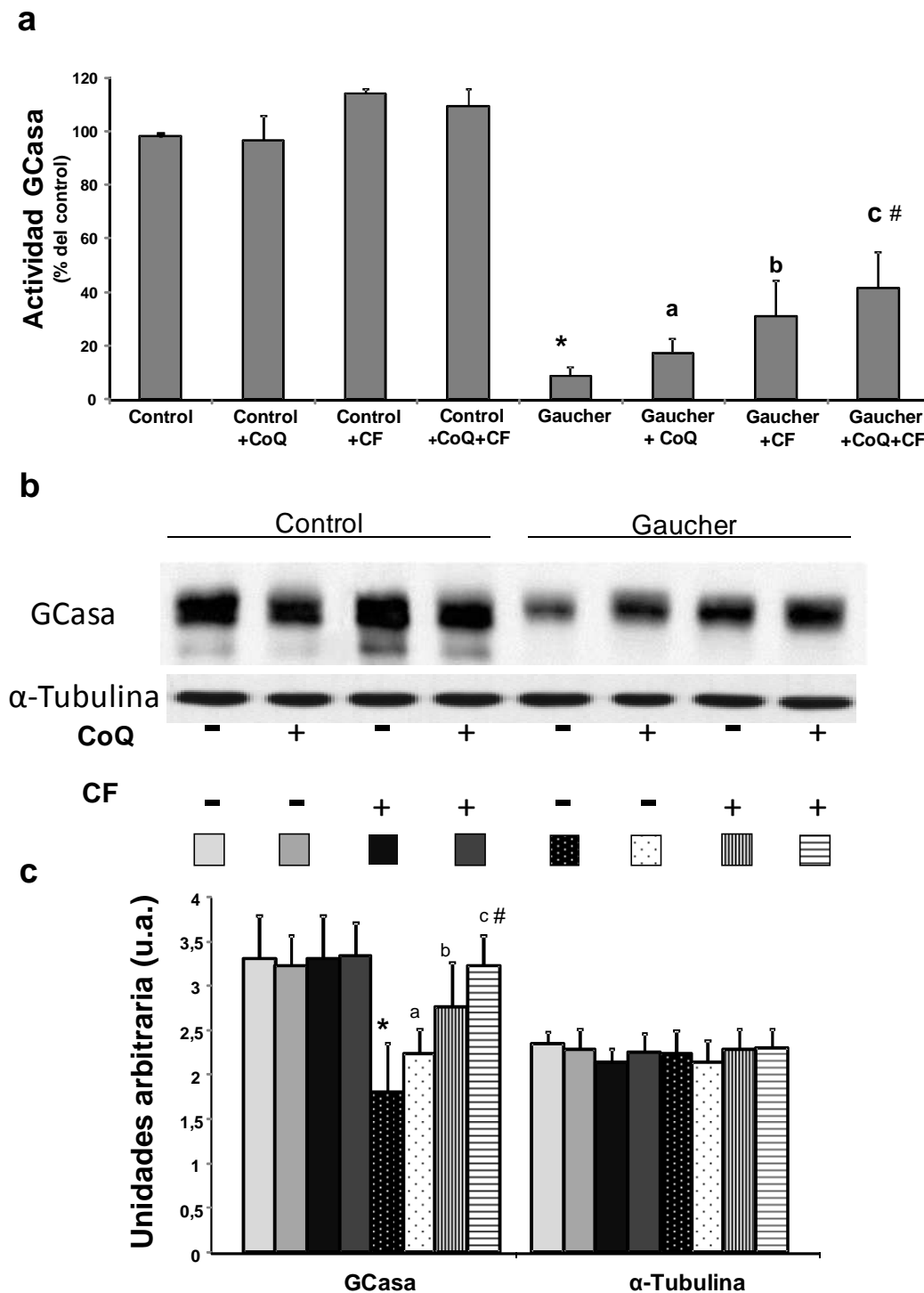


Figura 52. **El tratamiento con Coenzima Q₁₀ y la Chaperona farmacológica NAdBT-AIJ aumenta la actividad y los niveles de expresión de la enzima GCasa en fibroblastos derivados de pacientes con la enfermedad de Gaucher.** (a) Actividad glucocerebrosidasa en dos líneas de fibroblastos control y tres líneas de fibroblastos Gaucher L444P/L444P (Gaucher-A, Gaucher-B y Gaucher-C). Los datos se expresan como actividad Glucocerebrosidasa (% del control) y representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. (b) Expresión de los niveles de la proteína GCasa medida por Western blotting, tras el tratamiento durante 96 horas con CoQ, CF y CoQ+CF. La expresión de la proteína α -tubulina fue usada como control de carga. (c) Densitometría de la expresión de la proteína GCasa realizada por Western-Blotting con el software ImageJ. Los datos mostrados representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,01$ entre fibroblastos control y Fibroblastos Gaucher. ^a $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ. ^b $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con PC. ^c $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF. [#] $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF y CoQ o CF.

Para confirmar la recuperación de la actividad enzimática con el tratamiento combinado CoenzimaQ₁₀+NAdBT-AIJ determinamos igualmente la actividad enzimática en fibroblastos controles y 3 líneas de fibroblastos Gaucher portadores de la mutación L444P/L444P (Figura 53).

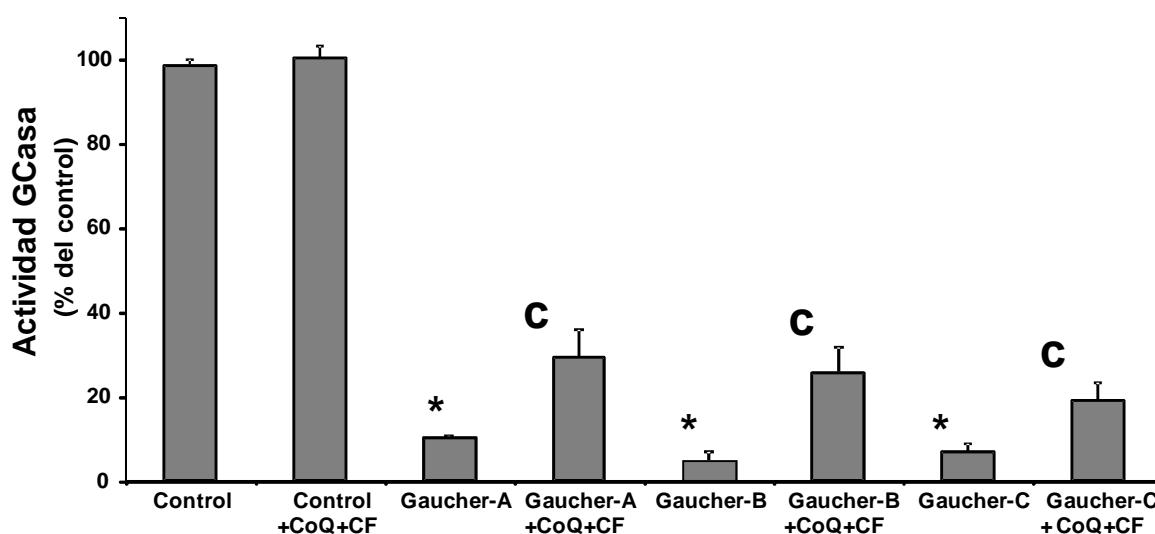


Figura 53. **El tratamiento combinado coenzima Q₁₀ y NAdBT-AIJ aumenta la actividad enzimática GCasa en fibroblastos derivados de pacientes con la enfermedad de Gaucher.** Actividad enzimática de la glucocerebrosidasa en dos líneas de fibroblastos control y tres líneas de fibroblastos Gaucher L444P/L444P (Gaucher-A, Gaucher-B y Gaucher-C). Los datos se expresan como actividad enzimática Glucocerebrosidasa (% del control) y representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y Fibroblastos Gaucher. $^{\circ}p < 0.05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF.

6.10.3 Efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ y NAdBT-AIJ sobre el tráfico de la glucocerebrosidasa hasta el lisosoma.

En la enfermedad de Gaucher la mutación L444P/L444P causa una disminución en la estabilidad de la proteína, que es degradada por el sistema de control de calidad de la célula. La ausencia de la proteína funcional es la causa principal de estas enfermedades y las chaperonas farmacológica ayudan a la recuperación de dicha funcionalidad y facilitan su transporte hacia el lisosoma. Previamente comprobamos el aumento de la expresión de la enzima GCasa mediante Western-Blotting y el incremento de su actividad enzimática con los tratamientos utilizados, especialmente con el tratamiento combinado COQ+FC.

Para averiguar la localización intracelular de la enzima lisosomal GCasa con y sin el tratamiento con CoQ+CF, realizamos ensayos de microscopía de fluorescencia con marcadores del retículo endoplasmático (PDI) donde se sintetiza la enzima lisosomal GCasa y marcadores lisosomales como el receptor de membrana del lisosoma LAMP-1. Las flechas amarillas indican la colocalización de ambos marcadores. El tratamiento conjunto de CoQ+CF, disminuye la señal de la glucocerebrosidasa que colocaliza con la proteína PDI del retículo endoplasmático, lo que sugiere que la proteína es transportada correctamente al aparato de Golgi y a los lisosomas (Figura 54a).

Para comprobar si el tráfico natural de la enzima glucocerebrosidasa hasta el lisosoma es restablecido tras el cotratamiento de CoQ y CF, como muestra la figura 48b. En ella se observa un ensayo de microscopía de fluorescencia con anticuerpos frente a la proteína LAMP-1 lisosomal y la glucocerebrosidasa. La colocalización de ambas proteínas confirma la presencia del enzima en el lisosoma. Los fibroblastos que fueron co-tratados con CoQ y la CF NAdBT-AIJ, tienen un perfil de tinción contra la Gcasa con mayor intensidad y colocalización con la proteína LAMP-1 lisosomal (Figura 52b). Para confirmar el tráfico de la glucocerebrosidasa hasta el lisosoma procedimos a realizar una digestión enzimática con la enzima Endoglicosidasa H (Endo-H) [195] y a continuación un Western blot,

de los extractos celulares de los fibroblastos control y fibroblastos Gaucher, tratados con CoQ, CF y CoQ+CF.

La Endo-H hidroliza oligosacáridos amino asociados a las asparraginas que son ricas en manosa, la GCasa retenida en el retículo endoplasmático contienen este patrón de N-glicosilación, que la hace sensible a la digestión con la Endoglicosidasa-H (Endo-H-S), mostrando una banda de menor peso molecular en el ensayo Western blotting y en las etapas donde la Gcasa ya pasó la mitad del aparato de Golgi, que ya no tiene este perfil de glicosilación, se hace resistente a la digestión con Endoglicosidasa-H (Endo-H-R), apareciendo una banda con mayor peso molecular en el ensayo Western blotting. En los fibroblastos control la mayor parte de la GCasa era resistente al corte con Endo-H (probablemente lisosomal madura) y por el contrario en los fibroblastos de pacientes Gaucher, mostró poca GCasa resistente al corte enzimático con Endo-H, lo que sugiere que una fracción significativa de la enzima GCasa en las células patológicas no alcanzaron la mitad del aparato de Golgi y por lo tanto no llegaron al lisosoma. El tratamiento con CoQ, CF y sobre todo el tratamiento con CoQ+CF incrementaron significativamente la banda que muestra la GCasa resistente al corte enzimático con Endo-H, apoyando la hipótesis de que los tratamientos restauran la GCasa mutada y es transportada correctamente al aparato de Golgi y a los lisosomas (Figuras 52c y 52d).

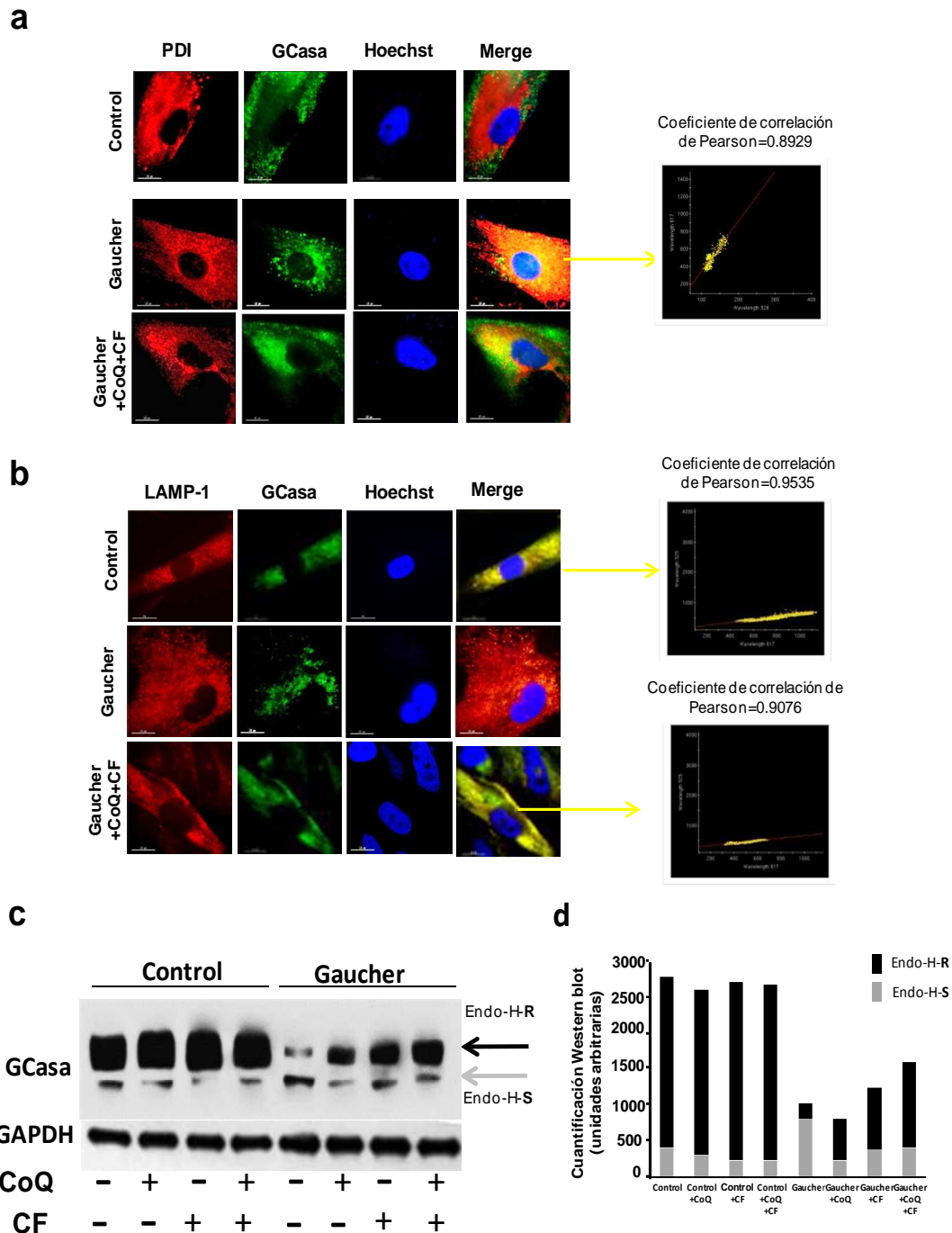


Figura 52. El tratamiento combinado con Coenzima Q₁₀ y la Chaperona farmacológica NAdBT-AIJ, cambia la localización intracelular de la enzima GCasa en fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Gaucher. (a) Imágenes de microscopía de fluorescencia que muestran la localización intracelular de la enzima GCasa. El marcador de retículo endoplasmático PDI se muestra en rojo y la enzima lisosomal GCasa en verde. En los fibroblastos Gaucher existe colocalización PDI-GBA, con el tratamiento la enzima sale del retículo vía lisosomal. **(b)** Esto lo comprobamos en las siguientes imágenes donde tenemos el marcador del lisosoma LAMP-1 en rojo y la enzima GCasa en verde. Las imágenes muestran en los fibroblastos controles colocalización LAMP-1-GCasa y los fibroblastos Gaucher tratados también nos muestra una mayor colocalización de la enzima GCasa con el marcador lisosomal LAMP-1, ya que el tratamiento CoQ+PC ha facilitado su transporte hacia el lisosoma. **(c)** Tratamiento con la enzima Endoglicosidasa H. Se añadió 1 µl de *Endo H* por cada 70 µg de proteína y para el análisis del peso molecular de la GCasa mediante Western blotting se llevó a cabo la desnaturalización de la EndoH mediante tratamiento térmico (10 minutos a 95°C) en presencia del tampón de desnaturalización suministrado con la casa comercial tal como se describe en el apartado de “Material Y Métodos”. **(d)** Cuantificación de la expresión de proteínas por Western-Blotting con el software ImageJ. Los datos mostrados representan la media ±DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,01$ entre fibroblastos control y Fibroblastos Gaucher. ^a $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ. ^b $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con PC. ^c $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF. ^d $p < 0,05$ entre la presencia y la ausencia de tratamiento con CoQ+CF y CoQ o CF.

6.11 Efecto del tratamiento con coenzima Q₁₀ y NAdBT-AIJ sobre los niveles de glucosilceramida.

Además, para confirmar la eficacia de la CF y / o tratamiento de CoQ en la mejora de la actividad glucocerebrosidasa, cuantificamos los niveles de GlcCer mediante un ensayo Dot-blot, tras el tratamiento con coenzima Q₁₀ y la chaperona farmacológica NAdBT-AIJ y de forma más significativa el tratamiento combinado de los fibroblastos dérmicos control y patológicos Gaucher, produjo una significativa reducción en los niveles de GlcCer en los fibroblastos Gaucher (Figuras 53a y 53b).

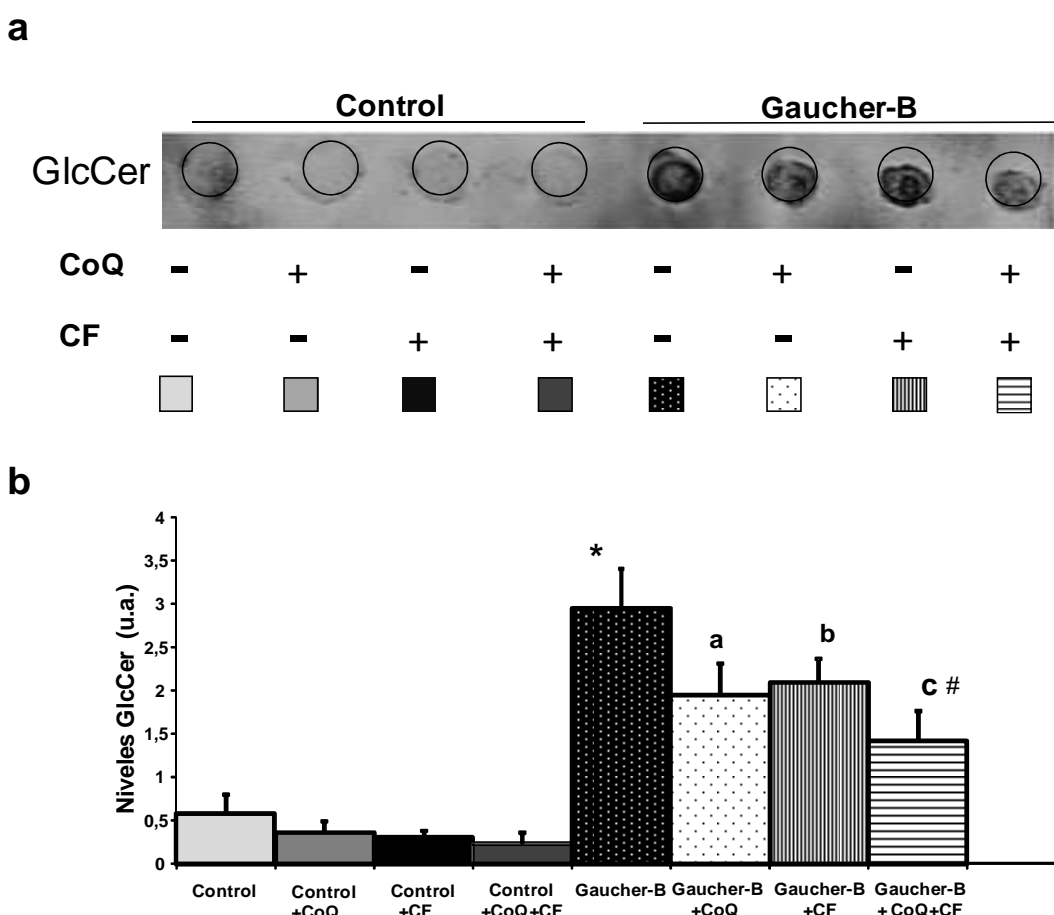


Figura 53. **La acumulación de GlcCer es parcialmente reducida por el tratamiento con coenzima Q₁₀ y NAdBT-AIJ.** (a) Cuantificación de los niveles de GlcCer mediante ensayo Dot-blot. Los fibroblastos dérmicos control y patológicos Gaucher portadores de la mutación L444P en homocigosis, fueron cultivados en la ausencia y presencia de CoQ (25 μ M), NAdBT-AIJ (25 μ M) o CoQ+CF (25 μ M+25 μ M) durante 96 h. (b) Análisis densitométrico del resultado del ensayo Dot-blot. Los datos se expresan en unidades arbitrarias (u.a.) Los datos son la media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes. *p<0.01 entre fibroblastos controles y Gaucher. ap<0.05 entre la presencia y ausencia de CoQ. bp<0.05 entre la presencia y ausencia de CF. cp<0.05 entre la presencia y ausencia de CoQ+CF. #p<0.05 entre tratamiento CoQ+ CF y CoQ o CF.

6.11.1 Efecto del tratamiento combinado coenzima Q₁₀ y NAdBT-AIJ sobre la acumulación de glucosilceramida en el compartimento lisosomal y mitocondrial.

Para comprobar si los tratamientos reducían los niveles de GlcCer en los fibroblastos patológicos. Realizamos un análisis mediante un ensayo de microscopía de inmunofluorescencia, que mostraba que en las células de pacientes con la enfermedad de Gaucher, existía acumulación de GlcCer en los compartimentos lisosomales y también en mitocondrias.

Se utilizó como marcador mitocondrial, el citocromo c, la sonda LysoTracker red DND-99 como marcador lisosomal y un marcador de la GlcCer. La microscopía de fluorescencia mostró que los fibroblastos controles mostraban menor cantidad de GlcCer, mayor cantidad de mitocondrias tubulares y menor captación del fluorocromo LysoTracker red DND-99.

La tinción de los lisosomas con la sonda LysoTracker red DND-99, colocalizaba con la GlcCer en los fibroblastos patológicos ($r=0.9107$) y la colocalización del citocromo c y GlcCer aunque menor ($r=0.7404$) fue significativa en las mitocondrias (Figura 54) de los fibroblastos Gaucher.

Además y se confirmó que el tratamiento conjunto CoQ + NAdBT-AIJ, mostraba una reducción en los niveles de GlcCer, tanto en el compartimento lisosomal, como en el mitocondrial, en los fibroblastos Gaucher (Figura 54).

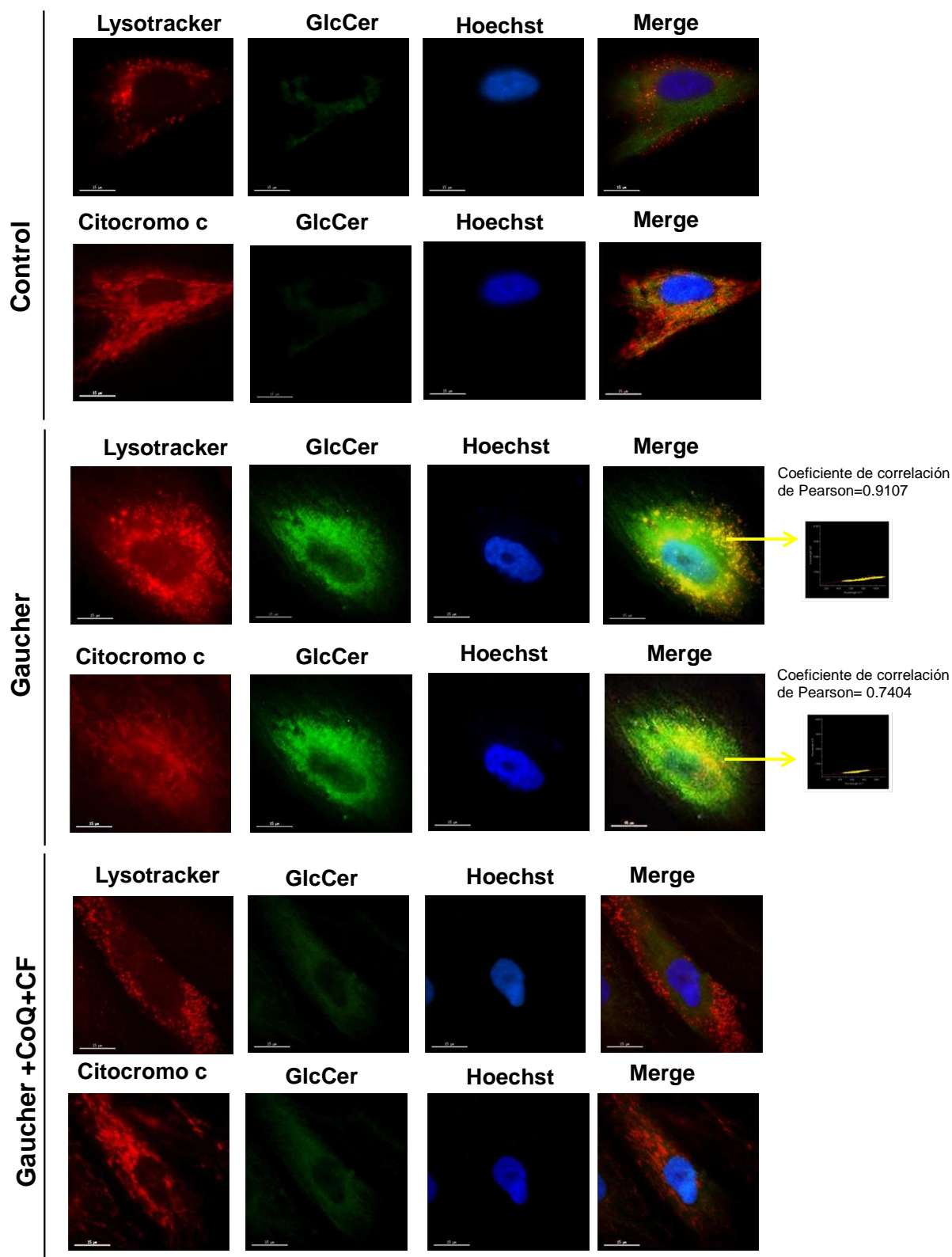


Figura 54. **Reducción de la acumulación de GlcCer tanto en el compartimento lisosomal como en el mitocondrial tras el tratamiento con coenzima Q₁₀ + NAdBT-AIJ.** Imágenes representativas de fluorescencia con la sonda Lysotracker red DND-99 como marcador de lisosomas, Citocromo c como marcador mitocondrial y glucosilceramida como marcador del esfingolípido. Colocalización positiva: Coeficiente de correlación de Pearson=0,9107, del marcador lisosomal con la glucosilceramida, indica su acumulación en el compartimento lisosomal y la colocalización positiva: Coeficiente de correlación de Pearson=0,7404 , del marcador mitocondrial con la glucosilceramida, indica su acumulación en las mitocondrias. Los núcleos fueron teñidos con la tinción de Hoechst. Escala de la Barra=15µM

Hemos demostrado que tanto la mutación 8344A>G del mtDNA en fibroblastos y cibridos MERRF y la mutación L444P/L444P en fibroblastos de pacientes con la enfermedad lisosomal de Gaucher afectan gravemente a la fisiología mitocondrial, mediante la disfunción de la CRM y la fosforilación oxidativa, la reducción del potencial de membrana mitocondrial y con ello los niveles de ATP y el aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Figura 55).

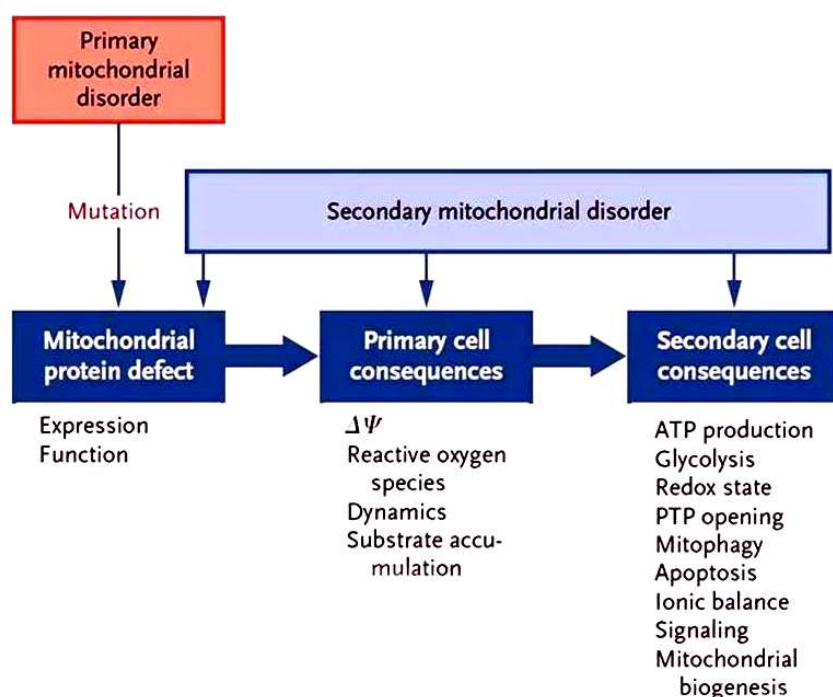


Figura 55 .**Consecuencias de la disfunción mitocondrial**

Además el exceso en la producción de ROS, es un reconocido agente implicado en diversos procesos fisiopatológicos y marcadores para la degradación selectiva de mitocondrias alteradas por mitofagia.

No obstante, el aumento persistente y masivo de la mitofagia puede desequilibrar los mecanismos compensatorios celulares produciendo efectos patológicos que empeoren el estado fisiológico celular.

Por último, el tratamiento in vitro con CoQ de fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF y cibridos transmitocondriales con la mutación 8344A> G revierte las alteraciones fisiopatológicas encontradas en estos modelos celulares y el

tratamiento combinado de la Coenzima Q₁₀ con la molécula NAdBT –AIJ, capaz de incrementar la actividad enzimática, muestra un beneficio terapéutico en el fenotipo bioquímico observado en los modelos celulares derivados de pacientes con la enfermedad de Gaucher portadores de la mutación L444P / L444P.

Todos estos datos se comentarán y discutirán más ampliamente en el siguiente apartado.

7. DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

La disfunción mitocondrial primaria se caracteriza por la presencia de mutaciones del DNA mitocondrial o nuclear que provocan directamente defectos en el metabolismo mitocondrial. Como ejemplo de disfunción mitocondrial primaria, hemos estudiado el síndrome MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers). La primera parte de este trabajo es un estudio de las alteraciones fisiopatológicas de la patología mitocondrial del síndrome MERRF, en cultivos primarios de fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF y cíbridos transmitocondriales, portadores de la mutación 8344A>G del mtDNA y como el tratamiento con CoQ revierte los efectos provocados por la disfunción mitocondrial en estos modelos celulares.

La disfunción mitocondrial secundaria es la causada por eventos patológicos que se originan fuera de las mitocondrias. Por ejemplo la disfunción mitocondrial secundaria en la enfermedad lisosomal de Gaucher, donde la pérdida de función de una enzima lisosomal genera un metabolismo anormal de varios sustratos que no se degradan y se acumulan progresivamente en los lisosomas, afectando la función de otros orgánulos como las mitocondrias. Estos eventos secundarios a la acumulación del material de depósito y a la acumulación extralisosomal del material no degradado provocan una disfunción subyacente en las mitocondrias. Las opciones terapéuticas son diferentes para una enfermedad con una disfunción mitocondrial secundaria ya que los tratamientos no están diseñados para actuar sobre la mitocondria directamente.

De esta manera existe una necesidad para tratar la disfunción mitocondrial, tanto primaria como secundaria, debido a la existencia de patrones fisiopatológicos comunes a pesar de tener un origen diferente.

En la segunda parte de este trabajo se llevó a cabo el estudio de las alteraciones fisiopatológicas de la enfermedad de Gaucher en cultivos primarios de fibroblastos derivados de pacientes con afectación neurológica con la enfermedad de Gaucher portadores de la mutación L444P/L444P y como la combinación de la coenzima Q₁₀ (CoQ) que mejora la función mitocondrial y disminuye el estrés autofágico, y de la chaperona farmacológica NAdBT-AIJ que aumenta la actividad de la enzima, produce un beneficio terapéutico sinérgico superior a la suma de los que producirían los tratamientos individuales. Por todo ello el tratamiento combinado representa una opción terapéutica mejorada para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher, especialmente para los tipos con afectación neurológica de la misma.

En la primera parte de este trabajo comprobamos que la función mitocondrial de los fibroblastos MERRF se encuentra alterada con una reducción en la expresión y la actividad de las enzimas que constituyen la cadena respiratoria mitocondrial, como se había descrito previamente [152]. Es importante destacar, que el contenido de CoQ, un transportador de electrones esencial de la cadena respiratoria mitocondrial, estaba reducido en los fibroblastos MERRF. Las deficiencias encontradas tanto en la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria, en la expresión de proteínas mitocondriales y en los niveles de CoQ, pueden perjudicar el flujo normal de electrones y el bombeo de protones en el sistema OXPHOS, induciendo una disminución del $\Delta\Psi_m$. Los resultados muestran que los fibroblastos MERRF poseen un gran número de mitocondrias despolarizadas. Este bajo potencial de membrana mitocondrial puede contribuir a agravar la disfunción mitocondrial y perturbar la bioenergética celular. Además, una reducción en el $\Delta\Psi_m$ también afectaría a la importación de proteínas a la mitocondria, lo que amplificaría la desorganización mitocondrial. Secundariamente, componentes críticos del sistema OXPHOS, como el coenzima Q, cuya biosíntesis depende de proteínas mitocondriales codificadas por el núcleo, también se verán afectados. Al menos diez genes han sido identificados en el genoma nuclear humano e implicados en la biosíntesis del CoQ (genes COQ). Las mutaciones en estos genes inducen deficiencia primaria de CoQ con diversas manifestaciones clínicas[219]. Las

deficiencias secundarias de CoQ, aquellas deficiencias que no se deben a mutaciones en los genes COQ, se encuentran en un amplio espectro de enfermedades, incluidas las enfermedades mitocondriales con mutaciones tanto en el genoma nuclear como mitocondrial, las enfermedades lisosomales, las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, en pacientes con cáncer, la fibromialgia y en pacientes bajo tratamiento con estatinas [121, 127, 220]. Actualmente, las deficiencias primarias y secundarias de CoQ tienen una gran relevancia debido a su alta prevalencia, fácil diagnóstico y potenciales tratamientos. La detección de la deficiencia secundaria de CoQ en las enfermedades mitocondriales en general, es de gran importancia porque el tratamiento con CoQ podría ser particularmente beneficioso en estos pacientes, para los que no existe actualmente ninguna opción de tratamiento eficaz.

Muchas de las alteraciones fisiopatológicas encontradas, como la deficiencia en la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria, el bajo potencial de membrana mitocondrial, la identificación de mitocondrias disfuncionales, el aumento de ROS y H₂O₂, el aumento de la peroxidación lipídica y el aumento de la expresión de las proteínas autofágicas en las células que tienen la mutación 8344A>G fueron revertidas mediante el tratamiento con CoQ tanto en fibroblastos derivados de pacientes como en los cíbridos mutantes MERRF. El tratamiento de CoQ es ampliamente utilizado en enfermedades mitocondriales por su importante papel en el metabolismo energético. Los efectos beneficiosos del tratamiento con CoQ incluyen: la mejora del transporte de electrones y la producción de ATP, la protección antioxidante, la regulación en la señalización redox, la estabilización del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, y la protección contra la autofagia y la apoptosis celular [64, 65, 104]. En general, los estudios sobre la eficacia del tratamiento de la CoQ en los trastornos mitocondriales han sido controvertidos. Las inconsistencias en los estudios clínicos, incluyendo las diferencias metodológicas, la forma de evaluar los resultados, las dosis utilizadas, la duración del tratamiento, y las combinaciones con otros fármacos, hacen que sea difícil tener una conclusión clara sobre los efectos de la CoQ en los pacientes con el síndrome MERRF.

La producción especies reactivas de oxígeno de (ROS) y el estrés oxidativo son consecuencias de la disfunción mitocondrial y de la deficiencia de CoQ₁₀ [64, 65]. Nuestros datos mostraron un aumento significativo en la generación de las ROS y H₂O₂ en los fibroblastos derivados de pacientes MERRF que mejoraban con el tratamiento con CoQ. Hipótesis recientes recientes han propuesto que el exceso de ROS puede inducir la transición de la permeabilidad mitocondrial por la apertura de poros no específicos en la membrana interna mitocondrial [221], provocando la caída del potencial de membrana mitocondrial y la apertura de poros de permeabilidad mitocondrial, provocando que la mitocondria sea permeable a los solutos hasta un peso molecular de aproximadamente 1500 Da. [222, 223]. A su vez, la alteración de la función mitocondrial que induce un aumento de estrés oxidativo mitocondrial y la alteración de la transición de permeabilidad mitocondrial, provoca la activación de la eliminación selectiva de esas mitocondrias malfuncionantes por autofagia.

En los fibroblastos MERRF que presentaban alteraciones patológicas más acusadas (enlentecimiento de la proliferación celular) hemos detectado deficiencias secundarias de Coenzima Q₁₀. La deficiencia secundaria de CoQ afecta gravemente a la fisiología celular mediante la disfunción del transporte electrónico y la fosforilación oxidativa, la disminución del potencial de membrana mitocondrial y los niveles de ATP y el aumento en la generación de radicales libres [64] . Estas alteraciones son parcialmente recuperadas tras el tratamiento con CoQ. Estos procesos patológicos conducen a la formación o liberación de moléculas alteradas (proteínas y/o lípidos oxidados) que inician una cascada de señales para que las mitocondrias disfuncionales sean degradadas selectivamente mediante mitofagia, y de esta forma proteger a la célula. En este sentido la mitofagia tendría un papel protector y necesario para la supervivencia celular. No obstante, el aumento persistente y masivo de la mitofagia puede desequilibrar los mecanismos compensatorios celulares y conducir a la muerte celular [65]. A medida que el número de mitocondrias dañadas y despolarizadas fueran aumentando, las células comenzarían a sufrir apoptosis. Para evitar este desequilibrio, el aumento de la

mitofagia en las enfermedades mitocondriales con deficiencia de CoQ ha de ir acompañado de un aumento compensatorio en la biogénesis mitocondrial.

Los resultados obtenidos en los modelos celulares MERRF demostraban un claro aumento de la expresión de los genes y proteínas implicados en el proceso autofágico ATG12, LC3 y Beclin 1. Con el objetivo de comprobar si la mitofagia estaba activada en las células patológicas, observamos puntos de colocalización correspondientes a autofagosomas con el marcador LC3 en la mitocondrias con bajo $\Delta\Psi_m$. En la red mitocondrial con morfología tubular y alto $\Delta\Psi_m$ no mostraron el marcaje de autofagosomas.

Estos resultados sugieren que la autofagia en los fibroblastos MERRF se caracteriza por una degradación selectiva y específica de estas mitocondrias disfuncionales por mitofagia.

En este sentido, existen estudios que han demostrado que el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), que es un importante componente del complejo del poro de transición de permeabilidad localizado en la membrana externa mitocondrial, es más susceptible al daño oxidativo en cíbridos con la mutación MERRF que en los cíbridos tipo control [155]. Es interesante destacar que nuevas investigaciones demuestran que una de las proteínas mitocondriales ubiquitinadas por Parkina (una proteína relacionada con la activación del proceso mitofágico en la enfermedad de Parkinson) es VDAC1 (voltage-dependent anion channel 1) que desempeña un importante papel en el poro de transición de permeabilidad mitocondrial [224].

Hemos confirmado que la deficiencia de CoQ y la activación de la mitofagia surgen como resultado de la mutación 8344A>G del DNA mitocondrial y no el producto de un defecto concomitante de los genes nucleares mediante el estudio de cíbridos transmitocondriales con la mutación 8344A>G. A su vez, el tratamiento con CoQ restauró las alteraciones fisiopatológicas encontradas en los cíbridos MERRF.

En este estudio concluimos que los fibroblastos y cíbridos MERRF causan una disfunción mitocondrial primaria que activan un programa de degradación selectiva de las mitocondrias disfuncionales por mitofagia y que el tratamiento con CoQ revierte las alteraciones fisiopatológicas encontradas en estos modelos celulares.

En la segunda parte del trabajo llevamos a cabo el estudio de la función mitocondrial en cultivos de fibroblastos derivados de pacientes con la patología lisosomal de Gaucher con afectación neurológica portadores de la mutación L444P/L444P. Analizamos el estado y el funcionamiento de la red mitocondrial, mostrando una disfunción mitocondrial secundaria asociada a la escasa actividad y reducida expresión de la enzima GCasa. Además de la activación de la mitofagia para eliminar las mitocondrias disfuncionales encontramos un deficiente flujo autofágico en los fibroblastos Gaucher. En estos cultivos celulares evaluamos el efecto de la CoQ sobre la disfunción mitocondrial observada en combinación con el compuesto NAdBT-AIJ, una molécula que se ha comprobado ser activa en fibroblastos con la mutación L444P en homocigosis, actuando como “chaperona farmacológica” y capaz de aumentar la actividad de GCasa mutada [200].

Nuestros resultados mostraron que el tratamiento combinado de la chaperona farmacológica NAdBT-AIJ destinada a mejorar el plegamiento de la enzima y la Coenzima Q₁₀ con el objetivo para mejorar la función mitocondrial y disminuir el estrés autofágico, permitió un beneficio terapéutico sinérgico, superior al que se estimaría por simple adición de los efectos de la chaperona y de la Coenzima Q₁₀, en los fibroblastos Gaucher.

En primer lugar observamos una reducción en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial asociado con una deficiencia secundaria en los niveles de CoQ₁₀. Como consecuencia de estas anomalías se confirmó que el potencial de membrana mitocondrial estaba disminuido en los fibroblastos Gaucher con una proporción elevada de mitocondrias despolarizadas aisladas de la red mitocondrial tubular. Los niveles de producción de energía en forma de ATP también estaban reducidos por efecto de la reducción del potencial de membrana mitocondrial. Ambas alteraciones, tanto el bajo potencial de membrana mitocondrial y la perturbación de la bioenergética celular puede contribuir a agravar la disfunción lisosomal en esta enfermedad.

El potencial de membrana mitocondrial fue parcialmente recuperado mediante los tratamientos individuales con CoQ, NAdBT-AIJ pero de forma más significativa con el tratamiento combinado CoQ+NAdBT-AIJ. Igualmente los tratamientos

consiguieron aumentar los niveles reducidos de ATP de forma proporcional al aumento del potencial mitocondrial.

Además de la deficiencia secundaria de CoQ y la disminución de potencial de membrana mitocondrial. Encontramos una asociación de la disfunción mitocondrial con un aumento significativo en la producción de las ROS y de H_2O_2 , así como un aumento en las proteínas implicadas en la autofagia en los fibroblastos derivados de pacientes Gaucher. Todas estas alteraciones fisiopatológicas fueron parcialmente mejoradas tras el tratamiento con CoQ, NAdBT-AIJ y especialmente con el tratamiento combinado CoQ+NAdBT-AIJ en los fibroblastos portadores de la mutación L444P/L444P. Existe una relación entre niveles altos de estrés oxidativo y activación de la autofagia. La alteración de la autofagia en las enfermedades lisosomales [225, 226] y en la enfermedad de Gaucher ha sido descrito previamente [227]. La deficiencia de la actividad enzimática de la GCasa provoca tanto una inducción de la autofagia como a un deterioro del flujo autofágico, lo que conlleva a la acumulación de autofagosomas y de sustratos no degradados, que pueden contribuir en varios aspectos en la neuropatología de la enfermedad de Gaucher, incluyen la acumulación de proteínas ubiquitinadas y un aumento en la producción de ROS. El estrés oxidativo es un factor relevante en su fisiopatología y puede jugar un papel destacado en la inducción de la disfunción mitocondrial y activación de la autofagia observada en los fibroblastos de pacientes Gaucher. En los modelos celulares Gaucher también observamos puntos de colocación del marcador de autofagosomas LC3 con las mitocondrias fragmentadas con reducido $\Delta\Psi_m$, sin observar el marcaje de autofagosomas en de las mitocondrias tubulares con elevado $\Delta\Psi_m$.

Estos resultados también sugieren que la autofagia en los fibroblastos derivados de pacientes Gaucher se caracteriza por una degradación selectiva y específica de estas mitocondrias disfuncionales por mitofagia.

La autofagia ha sido descrito como un mecanismo esencial para la regulación control de calidad mitocondrial [228-231]. El flujo autofágico se encuentra alterado en la mayoría de las enfermedades lisosomales [217, 230-233]. Además de la activación de la mitofagia observada, los fibroblastos derivados de pacientes

Gaucher mostraron una reducción del flujo autofágico que también puede tener un impacto importante en la función mitocondrial y la proteostasis celular, ya que la macroautofagia constitutiva mantiene la calidad mitocondrial [228], degradando selectivamente las mitocondrias disfuncionales por mitofagia [221, 234]. Además se ha observado en enfermedades lisosomales que proteínas mitocondriales se encuentran constantemente en autolisosomas purificados, especialmente subunidades de la ATPasa mitocondrial [235].

La reducción del flujo autofágico en la enfermedad de Gaucher puede contribuir a la acumulación de mitocondrias disfuncionales, como ocurre en otras enfermedades lisosomales, como en las neuronas de la enfermedad de Batten [160], y en otras muchas enfermedades de depósito lisosomal (Mucopolipidosis tipo IV [161], IIIA [polidistrofia pseudo-Hurler] y Tipo II o enfermedad de células de inclusión, Lipofuscinosis neuronal ceroid tardía infantil, Mucopolisacaridosis VI y Gangliosidosis GM1) entre otras, a la vez que muestran alteraciones mitocondriales, incluyendo la sustitución de la red mitocondrial tubular por un alto número de mitocondrias despolarizadas y redondeadas [162]. Los estudios sobre el envejecimiento y la formación del autofagosoma han demostrado que las mitocondrias están implicadas en las vías de señalización que regulan la apoptosis y la inmunidad innata, y que la reducción del flujo autofágico y la posterior acumulación de mitocondrias disfuncionales con mayor generación de ROS mitocondriales hacen a las células más sensibles a los estímulos apoptóticos y a los procesos inflamatorios [236]. Por lo tanto este funcionamiento aberrante de las mitocondrias puede ser responsable de la apoptosis e inflamación en el sistema nervioso central en muchas de las enfermedades de depósito lisosomal, incluyendo a la enfermedad de Gaucher. La disminución de la actividad catalítica de la GCasa provoca la acumulación intracelular de glucosil-esfingolípidos, glucosilceramida (GlcCer) y psicósina. Recientemente se ha demostrado en un modelo de ratón de la enfermedad de Gaucher con afectación neurológica, que la acumulación de psicósina en el cerebro precede a los procesos inflamatorios y existe una relación directa de la acumulación de la GlcCer y la inflamación [237]. Algunos autores han planteado que alteraciones del metabolismo de los glucoesfingolípidos, que incluyen

tanto la glucosilceramida y la ceramida, pueden desempeñar un papel importante en la disfunción mitocondrial asociada a la enfermedad de Gaucher. El posible efecto deletéreo de glucoesfingolípidos en la membrana mitocondrial y la bioenergética celular ya fue discutido por Strasberg [238] y también se ha sugerido que la acumulación de glucosilceramida y glucosilesfingosina, causan la pérdida de células neuronales en los tipos con afectación neurológica II /III de la enfermedad de Gaucher [237, 239]. Además se ha demostrado que las ceramidas alteran a las mitocondrias elevando el estrés oxidativo e induciendo una mitofagia letal [180]. Los estudios de fraccionamiento sub-celulares en fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Gaucher, mostraron que la acumulación de glucosilceramida no se limitaba a los lisosomas y su concentración estaba elevada en toda la célula [240].

De acuerdo con nuestros resultados, se encontró que la GlcCer se acumula principalmente en los compartimentos lisosomales y mitocondriales en fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Gaucher. Proponemos que tanto la acumulación de la GlcCer y el deterioro del flujo autofágico provocan disfunción mitocondrial secundaria en los fibroblastos de pacientes Gaucher. La disfunción mitocondrial ha sido implicada en la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas y desempeña un papel clave en la enfermedad de Parkinson [174]. Las neuronas son particularmente sensibles a la disfunción mitocondrial y se necesita una eliminación adecuada de las mitocondrias dañadas en las neuronas post-mitóticas, porque la acumulación progresiva de las mitocondrias alteradas podría conducir a una eventual muerte celular.

La disfunción mitocondrial asociada a la reducción de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria, a un aumento en la producción de ROS y a la disminución del potencial de membrana mitocondrial en neuronas y astrocitos, se ha constatado recientemente en un modelo de ratón de la enfermedad de Gaucher con afectación neurológica [239]. Por lo tanto, un defecto lisosomal primario puede causar eventos secundarios como la acumulación de mitocondrias disfuncionales. Los síntomas neurológicos y patológicos observados en pacientes con la enfermedad de Gaucher son similares a los que se muestran en la enfermedad de Parkinson, incluyendo la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la

sustancia negra, la acumulación de alfa-sinucleína, temblores en reposo, bradicinesia, y rigidez [174] . De hecho, el parkinsonismo se ha relacionado con la enfermedad de Gaucher, lo que sugiere una relación mecanicista entre estas dos enfermedades. Además, diferentes estudios multicéntricos han demostrado una alta incidencia de mutaciones en el gen GBA1 en pacientes con la enfermedad de Parkinson esporádica y un incremento en el riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson en los portadores de mutaciones en el gen GBA1 [241]. Una estrategia terapéutica emergente para el tratamiento de enfermedades de depósito lisosomal, ha sido el desarrollo de compuestos capaces de unirse al sitio activo y estabilizar el plegamiento apropiado, pudiendo actuar como “chaperonas farmacológicas” (CF) que facilitan el transporte de la forma catalíticamente activa a los lisosomas, estos compuestos con actividad de chaperona farmacológica, es de particular interés para aquellas manifestaciones clínicas de la enfermedad que involucran al sistema nervioso central [190]. Una importante ventaja de las CF es que son pequeñas moléculas que pueden ser administradas por vía oral, incluyendo la capacidad para atravesar la BHE, lo que las convierte en un potencial tratamiento para enfermedades de depósito lisosomal con afectación del sistema nervioso central [193]. Nuestros hallazgos confirman los resultados previos que muestran la eficacia de los derivados bicíclicos de L-idonojirimicina como chaperonas farmacológicas para los tipos con afectación neurológica de la enfermedad de Gaucher [200] . El compuesto NAdBT-AIJ aumentó la actividad GCasa y también facilitó la translocación de la enzima GCasa al lisosoma en fibroblastos de pacientes Gaucher portadores de la mutación L444P en homocigosis. Asimismo, dado que los defectos en el metabolismo energético y el aumento del estrés oxidativo se ha demostrado que desempeñan un papel clave en la patogénesis de la enfermedad de Gaucher, pensamos que el tratamiento con coenzima de CoQ también podría ejercer efectos terapéuticos beneficiosos. El papel que ejerce la CoQ en la bioenergética mitocondrial y sus propiedades antioxidantes, constituyen la base para sus aplicaciones clínicas, además algunos de sus efectos pueden estar relacionados con un mecanismo adicional de inducción de genes [242]. Además otros estudios ha demostrado que la CoQ también es capaz de atravesar la BHE [243]. Por lo tanto,

el tratamiento combinado de la CoQ con la chaperona farmacológica NAdBT-AIJ puede representar una estrategia terapéutica, complementaria o alternativa a la TRE en pacientes con la enfermedad de Gaucher con afectación del SNC. De hecho, nuestros resultados sugieren que el tratamiento combinado de la CoQ con NAdBT AIJ es altamente eficaz, mostrando un beneficio terapéutico en el fenotipo bioquímico observado en los modelos celulares derivados de pacientes con la enfermedad de Gaucher portadores de la mutación L444P / L444P.

La morfología de la red mitocondrial está relacionada con la aparición de distintas alteraciones. Tanto los modelos celulares MERRF y los Gaucher mostraron un metabolismo mitocondrial alterado asociado a la sustitución de la red mitocondrial ramificada por un alto número de mitocondrias, fragmentadas, aisladas y despolarizadas. Parece ser que este proceso de fragmentación y fisión mitocondrial es necesario, para que las mitocondrias defectivas o dañadas de la célula sean degradadas mediante mitofagia, proceso activado en ambos modelos celulares. Por tanto, la recuperación de la red mitocondrial con CoQ, se asocia con una mejora en la fisiopatología mitocondrial.

Hemos confirmado la existencia de mecanismos comunes a nivel de la alteración celular en 2 enfermedades que muestran disfunción mitocondrial por diferentes causas.

La primera hipótesis principal que nosotros planteamos y hemos confirmado experimentalmente es que los fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF y híbridos transmitocondriales con la mutación 8344A>G del mtDNA, causa una disfunción mitocondrial primaria y el tratamiento con coenzima Q₁₀ revierte las alteraciones fisiopatológicas encontradas en estos modelos celulares y su uso podría ser beneficioso en el tratamiento de pacientes con el síndrome MERRF.

Además para demostrar la segunda hipótesis que planteamos, los estudios llevado a cabo en los modelos celulares Gaucher, nos proporcionan una evidencia experimental de que el tratamiento mediante la combinación de la coenzima Q₁₀, orientada a corregir la disfunción mitocondrial secundaria y la chaperona farmacológica NAdBT AIJ con la función de aumentar la actividad enzimática de la

glucocerebrosidasa y su tráfico hacia los lisosomas, podría ser beneficioso en el tratamiento de pacientes con la enfermedad de Gaucher con afectación del sistema nervioso central. Sin embargo, aunque son esenciales experimentos adicionales en modelos celulares neuronales y animales para confirmar estos resultados Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la disfunción mitocondrial secundaria provocada por la acumulación de glucosilceramida agrava los efectos de la mutación L444P / L444P y por lo tanto, la corrección de la disfunción mitocondrial mediante el tratamiento con coenzima Q₁₀ ayuda a potenciar la actividad enzimática de la glucocerebrosidasa mutada y el hecho de que tanto la Coenzima Q₁₀ y la chaperona farmacológica NAdBT-AIJ puedan atravesar la barrera hematoencefálica las convierte en prometedoras candidatas para el tratamiento de las formas clínicas con afectación neurológica de la enfermedad de Gaucher que no responden a la terapia actual de sustitución enzimática.

8.CONCLUSIONES

8.CONCLUSIONES

- 1.** La disfunción mitocondrial en el síndrome de MERRF y la enfermedad de Gaucher afecta gravemente a la fisiología mitocondrial mediante la alteración del transporte electrónico y la fosforilación oxidativa, la reducción del potencial de membrana mitocondrial, el aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno y comprometiendo la bioenergética celular .
- 2.** La disfunción mitocondrial en los modelos celulares de la enfermedad de MERRF y Gaucher provoca la degradación selectiva por mitofagia de las mitocondrias dañadas y fragmentadas.
- 3.** El tratamiento con Coenzima Q₁₀ puede actuar tanto en la disfunción primaria y secundaria, atenuando el daño mitocondrial, reduciendo el número de mitocondrias malfuncionantes y la mitofagia.
- 4.** El tratamiento de los fibroblastos derivados de pacientes con el síndrome MERRF y cíbridos transmitocondriales con la mutación 8344A>G con Coenzima Q₁₀ revierte las alteraciones fisiopatológicas encontradas en estos modelos celulares.
- 5.** En la enfermedad de Gaucher, la disfunción mitocondrial secundaria provocada por la acumulación de glucosilceramida agrava los efectos de la mutación L444P / L444P mientras que la corrección de la disfunción mitocondrial mediante el tratamiento con coenzima Q₁₀ ayuda a potenciar la actividad enzimática de la glucocerebrosidasa mutada.
- 6.** El tratamiento combinado de la Coenzima Q₁₀ con la molécula NAdBT-AIJ muestra un beneficio terapéutico sinérgico en el fenotipo bioquímico observado en los modelos celulares derivados de pacientes con la enfermedad de Gaucher portadores de la mutación L444P / L444P.

9. PUBLICACIONES Y PATENTES

9. PUBLICACIONES Y PATENTES

PUBLICACIONES

- 1) **Recovery of MERRF fibroblasts and cybrids pathophysiology by coenzyme Q₁₀**
Mario De la Mata, Juan Garrido-Maraver, David Cotán, Mario D. Cordero, Manuel Oropesa-Ávila¹, Lourdes Gómez Izquierdo, Manuel De Miguel, Juan Bautista Lorite, Eloy Rivas Infante, Patricia Ybot, Sandra Jackson⁶ and José A. Sánchez-Alcázar.
 REVISTA: **Neurotherapeutics**. VOLUMEN: 9; PÁGINAS:446-463; AÑO 2012
- 2) **Pharmacological Chaperones and Coenzyme Q₁₀ Treatment Improves Mutant β -Glucocerebrosidase Activity and Mitochondrial Function in Neuronopathic Forms of Gaucher Disease.**
Mario de la Mata, David Cotán, Manuel Oropesa-Ávila, Juan Garrido-Maraver, Mario D. Cordero, Marina Villanueva Paz, Ana Delgado Pavón, Elisabet Alcocer-Gómez, Isabel de Laverá, Patricia Ybot-González, Ana Paula Zaderenko, Carmen Ortiz Mellet, José M. García Fernández, José A. Sánchez-Alcázar.
 REVISTA: **Scientific Reports**. 5:10903. doi: 10.1038/srep10903; AÑO 2015.
- 3) **Targeted Delivery of Pharmacological Chaperones for Gaucher Disease to Macrophages by a Mannosylated Cyclodextrin Carrier**
 Julio Rodríguez-Lavado, **Mario de la Mata**, José L. Jiménez Blanco, M. Isabel García-Moreno, Juan M. Benito, Antonio Díaz-Quintana, José A. Sánchez Alcázar, Katsumi Higaki, Eij Nanba, Kousaku Ohno, Yoshiyuki Suzuki, Carmen Ortiz Mellet, and José M. García Fernández
 REVISTA: **Organic & Biomolecular Chemistry**. VOLUMEN:14; PÁGINAS: 2289-2301; AÑO 2014
- 4) **Clinical applications of coenzyme Q₁₀**
 Juan Garrido-Maraver, Mario D. Cordero, Manuel Oropesa-Avila, Alejandro Fernández Vega, **Mario de la Mata**, Ana Delgado Pavon, Elisabet Alcocer-Gómez, Carmen Pérez Calero, Marina Villanueva Paz, Macarena Alanís, Isabel de Laverá, David Cotán, José A. Sánchez-Alcázar.
 REVISTA: **Frontiers in Bioscience**. VOLUMEN: 19; PÁGINAS:619-633; AÑO 2014
- 5) **Coenzyme Q₁₀ therapy**
 Juan Garrido Maraver, Mario D. Cordero, Manuel Oropesa-Ávila, Alejandro Fernández Vega, **Mario de la Mata**, Ana Delgado Pavón, Manuel de Miguel, Carmen Pérez Calero, Marina Villanueva Paz, David Cotán, and José A. Sánchez-Alcázar.
 REVISTA: **Molecular Syndromology**. VOLUMEN: 3-4; PÁGINAS:187-197; AÑO 2014

6) Mytophagy plays a protective role in fibroblasts from patients with coenzyme Q₁₀ deficiency

David Cotán, Ángeles Rodríguez Hernández, Mario D. Cordero, Juan Garrido Maraver, Manuel Oropesa-Ávila, **Mario de la Mata**, Alejandro Fernández Vega, Carmen Pérez Calero, Marina Villanueva Paz, Ana Delgado Pavón, Macarena Alanís Sánchez and José A. Sánchez Alcázar.

REVISTA: **Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection and aging**. VOLUMEN:1-10; PÁGINAS:131–144; AÑO 2013

PATENTES

COMPOSICIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ASOCIADAS A TRASTORNOS LISOSOMALES

Mario de la Mata Fernández, Carmen Ortiz Mellet, José M. García Fernández José A. Sánchez-Alcázar. P201530471; AÑO 2015

10.BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Schatz, G., *The magic garden*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 673-8.
2. DiMauro, S., *Mitochondrial DNA medicine*. Biosci Rep, 2007. **27**(1-3): p. 5-9.
3. Smith, R.A., et al., *Mitochondrial pharmacology*. Trends Pharmacol Sci, 2012. **33**(6): p. 341-52.
4. DePierre, J.W. and L. Ernster, *Enzyme topology of intracellular membranes*. Annu Rev Biochem, 1977. **46**: p. 201-62.
5. Vance, J.E., *MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(4): p. 595-609.
6. Huttemann, M., et al., *Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(12): p. 1701-20.
7. Wallace, D.C., W. Fan, and V. Procaccio, *Mitochondrial energetics and therapeutics*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 297-348.
8. Osyczka, A., C.C. Moser, and P.L. Dutton, *Fixing the Q cycle*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(4): p. 176-82.
9. Neupert, W., *Protein import into mitochondria*. Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 863-917.
10. Brenner, C. and M. Moulin, *Physiological roles of the permeability transition pore*. Circ Res, 2012. **111**(9): p. 1237-47.
11. Gray, M.W., G. Burger, and B.F. Lang, *Mitochondrial evolution*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1476-81.
12. Calvo, S.E. and V.K. Mootha, *The mitochondrial proteome and human disease*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2010. **11**: p. 25-44.
13. Garesse, R. and C.G. Vallejo, *Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes*. Gene, 2001. **263**(1-2): p. 1-16.
14. Debray, F.G., M. Lambert, and G.A. Mitchell, *Disorders of mitochondrial function*. Curr Opin Pediatr, 2008. **20**(4): p. 471-82.
15. Menkes, J.H., *Genetic disorders of mitochondrial function*. J Pediatr, 1987. **110**(2): p. 255-9.
16. Soubannier, V., et al., *A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes*. Curr Biol, 2012. **22**(2): p. 135-41.
17. Youle, R.J. and D.P. Narendra, *Mechanisms of mitophagy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(1): p. 9-14.
18. Youle, R.J. and A.M. van der Bliek, *Mitochondrial fission, fusion, and stress*. Science, 2012. **337**(6098): p. 1062-5.
19. Klionsky, D.J., *Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve*. Autophagy, 2008. **4**(6): p. 740-3.
20. Levine, B. and D.J. Klionsky, *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 463-77.
21. Mizushima, N., *Autophagy: process and function*. Genes Dev, 2007. **21**(22): p. 2861-73.

22. Galluzzi, L., et al., *Metabolic control of autophagy*. Cell, 2014. **159**(6): p. 1263-76.
23. Li, W.W., J. Li, and J.K. Bao, *Microautophagy: lesser-known self-eating*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(7): p. 1125-36.
24. Cuervo, A.M. and E. Wong, *Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging*. Cell Res, 2014. **24**(1): p. 92-104.
25. Tsukada, M. and Y. Ohsumi, *Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 1993. **333**(1-2): p. 169-74.
26. Klionsky, D.J., *Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(11): p. 931-7.
27. Su, J., et al., *Autophagy activation contributes to the neuroprotection of remote ischemic preconditioning against focal cerebral ischemia in rats*. Neurochem Res, 2014. **39**(11): p. 2068-77.
28. Jing, C.H., et al., *Autophagy activation is associated with neuroprotection against apoptosis via a mitochondrial pathway in a rat model of subarachnoid hemorrhage*. Neuroscience, 2012. **213**: p. 144-53.
29. Yan, W., et al., *Autophagy activation is involved in neuroprotection induced by hyperbaric oxygen preconditioning against focal cerebral ischemia in rats*. Brain Res, 2011. **1402**: p. 109-21.
30. Lopez de Figueroa, P., et al., *Autophagy activation and protection from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes*. Arthritis Rheumatol, 2015. **67**(4): p. 966-76.
31. Debnath, J., E.H. Baehrecke, and G. Kroemer, *Does autophagy contribute to cell death?* Autophagy, 2005. **1**(2): p. 66-74.
32. Bellu, A.R., et al., *Peroxisome biogenesis and selective degradation converge at Pex14p*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 44570-4.
33. Lemasters, J.J., *Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging*. Rejuvenation Res, 2005. **8**(1): p. 3-5.
34. St-Pierre, J., et al., *Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 44784-90.
35. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 1-13.
36. Elmore, S.P., et al., *The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes*. FASEB J, 2001. **15**(12): p. 2286-7.
37. Zorov, D.B., et al., *Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore*. Cardiovasc Res, 2009. **83**(2): p. 213-25.
38. Redmann, M., et al., *Mitophagy mechanisms and role in human diseases*. Int J Biochem Cell Biol, 2014. **53**: p. 127-33.
39. Wang, Y., et al., *ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy*. Autophagy, 2012. **8**(10): p. 1462-76.
40. Lee, J., S. Giordano, and J. Zhang, *Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling*. Biochem J, 2012. **441**(2): p. 523-40.

41. Higdon, A.N., et al., *Hemin causes mitochondrial dysfunction in endothelial cells through promoting lipid peroxidation: the protective role of autophagy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(7): p. H1394-409.
42. Kanki, T. and D.J. Klionsky, *Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism*. J Biol Chem, 2008. **283**(47): p. 32386-93.
43. Sandoval, H., et al., *Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells*. Nature, 2008. **454**(7201): p. 232-5.
44. Allen, G.F., et al., *Loss of iron triggers PINK1/Parkin-independent mitophagy*. EMBO Rep, 2013. **14**(12): p. 1127-35.
45. Narendra, D., et al., *Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy*. J Cell Biol, 2008. **183**(5): p. 795-803.
46. Springer, W. and P.J. Kahle, *Regulation of PINK1-Parkin-mediated mitophagy*. Autophagy, 2011. **7**(3): p. 266-78.
47. Jin, S.M., et al., *Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL*. J Cell Biol, 2010. **191**(5): p. 933-42.
48. Matsuda, N., et al., *PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy*. J Cell Biol, 2010. **189**(2): p. 211-21.
49. Kondapalli, C., et al., *PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65*. Open Biol, 2012. **2**(5): p. 120080.
50. Sarraf, S.A., et al., *Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization*. Nature, 2013. **496**(7445): p. 372-6.
51. Geisler, S., et al., *PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(2): p. 119-31.
52. Kirkin, V., et al., *A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates*. Mol Cell, 2009. **33**(4): p. 505-16.
53. Gegg, M.E., et al., *Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(24): p. 4861-70.
54. Twig, G., et al., *Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy*. Embo J, 2008. **27**(2): p. 433-46.
55. Twig, G. and O.S. Shirihai, *The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(10): p. 1939-51.
56. Machida, Y., et al., *Common anti-apoptotic roles of parkin and alpha-synuclein in human dopaminergic cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(1): p. 233-40.
57. Sena, L.A. and N.S. Chandel, *Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species*. Mol Cell, 2012. **48**(2): p. 158-67.
58. Voos, W., *Chaperone-protease networks in mitochondrial protein homeostasis*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(2): p. 388-99.
59. Baker, B.M. and C.M. Haynes, *Mitochondrial protein quality control during biogenesis and aging*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(5): p. 254-61.

60. Song, Y., et al., *The different molecular mechanisms of mitophagy between yeast and mammals*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2014. **24**(1): p. 29-38.
61. Hill, B.G., et al., *Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy*. Biol Chem, 2012. **393**(12): p. 1485-1512.
62. Zhang, J., *Autophagy and Mitophagy in Cellular Damage Control*. Redox Biol, 2013. **1**(1): p. 19-23.
63. Hatano, T., *A novel protein degradation system in young-onset Parkinson's disease: mitophagy is a therapeutic target as a quality control for damaged mitochondria*. Mov Disord, 2011. **26**(5): p. 773.
64. Cotan, D., et al., *Secondary coenzyme Q10 deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts*. FASEB J, 2011. **25**(8): p. 2669-87.
65. Rodriguez-Hernandez, A., et al., *Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy*. Autophagy, 2009. **5**(1): p. 19-32.
66. Osellame, L.D. and M.R. Duchen, *Quality control gone wrong: mitochondria, lysosomal storage disorders and neurodegeneration*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(8): p. 1958-72.
67. Corona, J.C. and M.R. Duchen, *Impaired mitochondrial homeostasis and neurodegeneration: towards new therapeutic targets?* J Bioenerg Biomembr, 2015. **47**(1-2): p. 89-99.
68. Archer, S.L., *Mitochondrial fission and fusion in human diseases*. N Engl J Med, 2014. **370**(11): p. 1074.
69. Chen, H. and D.C. Chan, *Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(R2): p. R169-76.
70. Chan, D.C., *Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development*. Cell, 2006. **125**(7): p. 1241-52.
71. Gomes, L.C. and L. Scorrano, *High levels of Fis1, a pro-fission mitochondrial protein, trigger autophagy*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(7-8): p. 860-6.
72. Yousif, L.F., K.M. Stewart, and S.O. Kelley, *Targeting mitochondria with organelle-specific compounds: strategies and applications*. Chembiochem, 2009. **10**(12): p. 1939-50.
73. Davidson, S.M., et al., *Mitochondrial pharmacology: energy, injury and beyond*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(8): p. 1795-7.
74. Bugiani, M., et al., *Effects of riboflavin in children with complex II deficiency*. Brain Dev, 2006. **28**(9): p. 576-81.
75. Tarnopolsky, M.A., B.D. Roy, and J.R. MacDonald, *A randomized, controlled trial of creatine monohydrate in patients with mitochondrial cytopathies*. Muscle Nerve, 1997. **20**(12): p. 1502-9.
76. Anders, M.W., *Putting bioactivation reactions to work: Targeting antioxidants to mitochondria*. Chem Biol Interact, 2011. **192**(1-2): p. 8-13.
77. Milagros Rocha, M. and V.M. Victor, *Targeting antioxidants to mitochondria and cardiovascular diseases: the effects of mitoquinone*. Med Sci Monit, 2007. **13**(7): p. RA132-45.
78. Murphy, M.P. and R.A. Smith, *Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007. **47**: p. 629-56.

79. Sheu, S.S., D. Nauduri, and M.W. Anders, *Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1762**(2): p. 256-65.
80. Hardie, D.G., F.A. Ross, and S.A. Hawley, *AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 251-62.
81. Palikaras, K., E. Lionaki, and N. Tavernarakis, *Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis*. Cell Death Differ, 2015. **22**(9): p. 1399-401.
82. Kukidome, D., et al., *Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells*. Diabetes, 2006. **55**(1): p. 120-7.
83. Palikaras, K. and N. Tavernarakis, *Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis*. Exp Gerontol, 2014. **56**: p. 182-8.
84. Crane, F.L., *Biochemical functions of coenzyme Q10*. J Am Coll Nutr, 2001. **20**(6): p. 591-8.
85. Festenstein, G.N., et al., *A constituent of the unsaponifiable portion of animal tissue lipids (λ max. 272 m μ)*. Biochem J, 1955. **59**(4): p. 558-66.
86. Crane, F.L., et al., *Isolation of a quinone from beef heart mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 1957. **25**(1): p. 220-1.
87. Mitchell, P., *Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems*. J Theor Biol, 1976. **62**(2): p. 327-67.
88. Kagan, V.E., et al., *Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes*. Free Radic Biol Med, 1990. **9**(2): p. 117-26.
89. Echtay, K.S., et al., *Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1416-21.
90. Papucci, L., et al., *Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 28220-8.
91. Quinzii, C.M., et al., *Reactive oxygen species, oxidative stress, and cell death correlate with level of CoQ10 deficiency*. FASEB J, 2010. **24**(10): p. 3733-43.
92. Mohr, D., V.W. Bowry, and R. Stocker, *Dietary supplementation with coenzyme Q10 results in increased levels of ubiquinol-10 within circulating lipoproteins and increased resistance of human low-density lipoprotein to the initiation of lipid peroxidation*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1126**(3): p. 247-54.
93. Navas, P., J.M. Villalba, and R. de Cabo, *The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses*. Mitochondrion, 2007. **7 Suppl**: p. S34-40.
94. Turunen, M., J. Olsson, and G. Dallner, *Metabolism and function of coenzyme Q*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1660**(1-2): p. 171-99.
95. Gille, L. and H. Nohl, *The existence of a lysosomal redox chain and the role of ubiquinone*. Arch Biochem Biophys, 2000. **375**(2): p. 347-54.
96. Barroso, M.P., et al., *Plasma membrane ubiquinone controls ceramide production and prevents cell death induced by serum withdrawal*. J Bioenerg Biomembr, 1997. **29**(3): p. 259-67.

97. Navas, P. and J. Manuel Villalba, *Regulation of ceramide signaling by plasma membrane coenzyme Q reductases*. Methods Enzymol, 2004. **378**: p. 200-6.
98. Navas, P., et al., *Ceramide-dependent caspase 3 activation is prevented by coenzyme Q from plasma membrane in serum-deprived cells*. Free Radic Res, 2002. **36**(4): p. 369-74.
99. Fernandez-Ayala, D.J., et al., *Coenzyme Q protects cells against serum withdrawal-induced apoptosis by inhibition of ceramide release and caspase-3 activation*. Antioxid Redox Signal, 2000. **2**(2): p. 263-75.
100. Jiang, W. and B. Ogretmen, *Ceramide stress in survival versus lethal autophagy paradox: ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy*. Autophagy, 2013. **9**(2): p. 258-9.
101. Bhandary, B., et al., *An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases*. Int J Mol Sci, 2012. **14**(1): p. 434-56.
102. Yubero-Serrano, E.M., et al., *Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 modifies the expression of proinflammatory and endoplasmic reticulum stress-related genes in elderly men and women*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2012. **67**(1): p. 3-10.
103. Bentinger, M., et al., *Distribution and breakdown of labeled coenzyme Q10 in rat*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(5): p. 563-75.
104. Armstrong, J.S., et al., *The Coenzyme Q10 analog decylubiquinone inhibits the redox-activated mitochondrial permeability transition: role of mitochondrial [correction mitochondrial] complex III*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 49079-84.
105. Kagan, T., et al., *Coenzyme Q10 can in some circumstances block apoptosis, and this effect is mediated through mitochondria*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **887**: p. 31-47.
106. Groneberg, D.A., et al., *Coenzyme Q10 affects expression of genes involved in cell signalling, metabolism and transport in human CaCo-2 cells*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2005. **37**(6): p. 1208-18.
107. Schmelzer, C., et al., *Functions of coenzyme Q10 in inflammation and gene expression*. Biofactors, 2008. **32**(1-4): p. 179-83.
108. Quinzii, C.M. and M. Hirano, *Primary and secondary CoQ(10) deficiencies in humans*. Biofactors, 2011. **37**(5): p. 361-5.
109. Quinzii, C.M., et al., *Coenzyme Q deficiency and cerebellar ataxia associated with an aprataxin mutation*. Neurology, 2005. **64**(3): p. 539-41.
110. Aeby, A., et al., *Cardiofaciocutaneous (CFC) syndrome associated with muscular coenzyme Q10 deficiency*. J Inherit Metab Dis, 2007. **30**(5): p. 827.
111. Mischley, L.K., J. Allen, and R. Bradley, *Coenzyme Q10 deficiency in patients with Parkinson's disease*. J Neurol Sci, 2012. **318**(1-2): p. 72-5.
112. Shults, C.W., et al., *Coenzyme Q10 levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects*. Ann Neurol, 1997. **42**(2): p. 261-4.
113. Sohmiya, M., et al., *Redox status of plasma coenzyme Q10 indicates elevated systemic oxidative stress in Parkinson's disease*. J Neurol Sci, 2004. **223**(2): p. 161-6.
114. Lee, J., J.H. Boo, and H. Ryu, *The failure of mitochondria leads to neurodegeneration: Do mitochondria need a jump start?* Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(14): p. 1316-23.

115. Wadsworth, T.L., et al., *Evaluation of coenzyme Q as an antioxidant strategy for Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2008. **14**(2): p. 225-34.
116. Stack, E.C., W.R. Matson, and R.J. Ferrante, *Evidence of oxidant damage in Huntington's disease: translational strategies using antioxidants*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1147**: p. 79-92.
117. Cooper, J.M., et al., *Coenzyme Q10 and vitamin E deficiency in Friedreich's ataxia: predictor of efficacy of vitamin E and coenzyme Q10 therapy*. Eur J Neurol, 2008. **15**(12): p. 1371-9.
118. Hart, P.E., et al., *Antioxidant treatment of patients with Friedreich ataxia: four-year follow-up*. Arch Neurol, 2005. **62**(4): p. 621-6.
119. Ramsey, C.P. and B.I. Giasson, *Role of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: Implications for treatment*. Drugs Aging, 2007. **24**(2): p. 95-105.
120. Cordero, M.D., et al., *Oxidative stress correlates with headache symptoms in fibromyalgia: coenzyme Q(1)(0) effect on clinical improvement*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35677.
121. Cordero, M.D., et al., *Mitochondrial dysfunction and mitophagy activation in blood mononuclear cells of fibromyalgia patients: implications in the pathogenesis of the disease*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(1): p. R17.
122. Jager, S., et al., *AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(29): p. 12017-22.
123. Ishibashi, Y. and Y. Hirabayashi, *AMP-activated Protein Kinase Suppresses Biosynthesis of Glucosylceramide by Reducing Intracellular Sugar Nucleotides*. J Biol Chem, 2015. **290**(29): p. 18245-60.
124. Witting, P.K., et al., *Anti-atherogenic effect of coenzyme Q10 in apolipoprotein E gene knockout mice*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(3-4): p. 295-305.
125. Lee, B.J., et al., *Coenzyme Q10 supplementation reduces oxidative stress and increases antioxidant enzyme activity in patients with coronary artery disease*. Nutrition, 2012. **28**(3): p. 250-5.
126. Lee, B.J., et al., *Effects of coenzyme Q10 supplementation on inflammatory markers (high-sensitivity C-reactive protein, interleukin-6, and homocysteine) in patients with coronary artery disease*. Nutrition, 2012. **28**(7-8): p. 767-72.
127. Sacconi, S., et al., *Coenzyme Q10 is frequently reduced in muscle of patients with mitochondrial myopathy*. Neuromuscul Disord, 2010. **20**(1): p. 44-8.
128. Kerr, D.S., *Treatment of mitochondrial electron transport chain disorders: a review of clinical trials over the past decade*. Mol Genet Metab, 2010. **99**(3): p. 246-55.
129. Berbel-Garcia, A., et al., *Coenzyme Q 10 improves lactic acidosis, strokelike episodes, and epilepsy in a patient with MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes)*. Clin Neuropharmacol, 2004. **27**(4): p. 187-91.
130. Chandra, S.R., et al., *A typical case of myoclonic epilepsy with ragged red fibers (MERRF) and the lessons learned*. J Postgrad Med, 2015. **61**(3): p. 200-2.
131. Garrido-Maraver, J., et al., *Screening of effective pharmacological treatments for MELAS syndrome using yeasts, fibroblasts and cybrid models of the disease*. Br J Pharmacol, 2012. **167**(6): p. 1311-28.

132. Vazquez, M.C., et al., *Oxidative stress: a pathogenic mechanism for Niemann-Pick type C disease*. *Oxid Med Cell Longev*, 2012. **2012**: p. 205713.
133. Yubero, D., et al., *Molecular diagnosis of coenzyme Q10 deficiency*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015. **15**(8): p. 1049-59.
134. Matalonga, L., et al., *Treatment effect of coenzyme Q(10) and an antioxidant cocktail in fibroblasts of patients with Sanfilippo disease*. *J Inherit Metab Dis*, 2014. **37**(3): p. 439-46.
135. Pulkes, T. and M.G. Hanna, *Human mitochondrial DNA diseases*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. **49**(1-2): p. 27-43.
136. Zeviani, M. and V. Carelli, *Mitochondrial disorders*. *Curr Opin Neurol*, 2007. **20**(5): p. 564-71.
137. Schaefer, A.M., et al., *The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1659**(2-3): p. 115-20.
138. Kirkinezos, I.G. and C.T. Moraes, *Reactive oxygen species and mitochondrial diseases*. *Semin Cell Dev Biol*, 2001. **12**(6): p. 449-57.
139. Anderson, S., et al., *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. *Nature*, 1981. **290**(5806): p. 457-65.
140. Taylor, R.W. and D.M. Turnbull, *Mitochondrial DNA mutations in human disease*. *Nat Rev Genet*, 2005. **6**(5): p. 389-402.
141. Greaves, L.C. and R.W. Taylor, *Mitochondrial DNA mutations in human disease*. *IUBMB Life*, 2006. **58**(3): p. 143-51.
142. Yarham, J.W., et al., *Mitochondrial tRNA mutations and disease*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2010. **1**(2): p. 304-24.
143. Wallace, D.C., *Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(19): p. 8739-46.
144. DiMauro, S. and M. Hirano, *Mitochondrial encephalomyopathies: an update*. *Neuromuscul Disord*, 2005. **15**(4): p. 276-86.
145. Fukuhara, N., et al., *Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? Light-and electron-microscopic studies of two cases and review of literature*. *J Neurol Sci*, 1980. **47**(1): p. 117-33.
146. Blakely, E.L., et al., *A new mitochondrial transfer RNAPro gene mutation associated with myoclonic epilepsy with ragged-red fibers and other neurological features*. *Arch Neurol*, 2009. **66**(3): p. 399-402.
147. Virgilio, R., et al., *Mitochondrial DNA G8363A mutation in the tRNA Lys gene: clinical, biochemical and pathological study*. *J Neurol Sci*, 2009. **281**(1-2): p. 85-92.
148. Yasukawa, T., et al., *Defect in modification at the anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNA(Lys) with the MERRF encephalomyopathy pathogenic mutation*. *FEBS Lett*, 2000. **467**(2-3): p. 175-8.
149. Kirino, Y. and T. Suzuki, *Human mitochondrial diseases associated with tRNA wobble modification deficiency*. *RNA Biol*, 2005. **2**(2): p. 41-4.
150. Enriquez, J.A., A. Chomyn, and G. Attardi, *MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA(Lys) and premature translation termination*. *Nat Genet*, 1995. **10**(1): p. 47-55.

151. Chomyn, A., et al., *In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(4): p. 2236-44.
152. James, A.M., et al., *Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations*. Biochem J, 1996. **318 (Pt 2)**: p. 401-7.
153. James, A.M., et al., *Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations*. Eur J Biochem, 1999. **259**(1-2): p. 462-9.
154. Boulet, L., G. Karpati, and E.A. Shoubridge, *Distribution and threshold expression of the tRNA(Lys) mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF)*. Am J Hum Genet, 1992. **51**(6): p. 1187-200.
155. Wu, S.B., et al., *Mitochondrial DNA mutation-elicited oxidative stress, oxidative damage, and altered gene expression in cultured cells of patients with MERRF syndrome*. Mol Neurobiol, 2010. **41**(2-3): p. 256-66.
156. Shoffner, J.M., et al., *Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation*. Cell, 1990. **61**(6): p. 931-7.
157. Erol, I., et al., *Demyelinating disease of central and peripheral nervous systems associated with a A8344G mutation in tRNALys*. Neuromuscul Disord, 2009. **19**(4): p. 275-8.
158. Wallace, D.C., et al., *Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease*. Cell, 1988. **55**(4): p. 601-10.
159. Murphy, M.P., *Mitochondria--a neglected drug target*. Curr Opin Investig Drugs, 2009. **10**(10): p. 1022-4.
160. Ezaki, J., L.S. Wolfe, and E. Kominami, *Specific delay in the degradation of mitochondrial ATP synthase subunit c in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis is derived from cellular proteolytic dysfunction rather than structural alteration of subunit c*. J Neurochem, 1996. **67**(4): p. 1677-87.
161. Jennings, J.J., Jr., et al., *Mitochondrial aberrations in mucopolidosis Type IV*. J Biol Chem, 2006. **281**(51): p. 39041-50.
162. Platt, F.M., B. Boland, and A.C. van der Spoel, *The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction*. J Cell Biol, 2012. **199**(5): p. 723-34.
163. Settembre, C., et al., *A block of autophagy in lysosomal storage disorders*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(1): p. 119-29.
164. Cleeter, M.W., et al., *Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage*. Neurochem Int, 2013. **62**(1): p. 1-7.
165. Osellame, L.D. and M.R. Duchen, *Defective quality control mechanisms and accumulation of damaged mitochondria link Gaucher and Parkinson diseases*. Autophagy, 2013. **9**(10): p. 1633-5.
166. Xu, Y.H., et al., *Multiple pathogenic proteins implicated in neuronopathic Gaucher disease mice*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(15): p. 3943-57.
167. Groen, J., *The hereditary mechanism of Gaucher's disease*. Blood, 1948. **3**(11): p. 1238-49.

168. Brady, R.O., J.N. Kanfer, and D. Shapiro, *Metabolism of Glucocerebrosides. II. Evidence of an Enzymatic Deficiency in Gaucher's Disease*. Biochem Biophys Res Commun, 1965. **18**: p. 221-5.
169. Barton, N.W., et al., *Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease*. N Engl J Med, 1991. **324**(21): p. 1464-70.
170. Brady, R.O., et al., *Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified glucocerebrosidase in Gaucher's disease*. N Engl J Med, 1974. **291**(19): p. 989-93.
171. Grabowski, G.A., *Gaucher disease: gene frequencies and genotype/phenotype correlations*. Genet Test, 1997. **1**(1): p. 5-12.
172. Nalls, M.A., et al., *A multicenter study of glucocerebrosidase mutations in dementia with Lewy bodies*. JAMA Neurol, 2013. **70**(6): p. 727-35.
173. Sidransky, E., et al., *Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease*. N Engl J Med, 2009. **361**(17): p. 1651-61.
174. Westbroek, W., A.M. Gustafson, and E. Sidransky, *Exploring the link between glucocerebrosidase mutations and parkinsonism*. Trends Mol Med, 2011. **17**(9): p. 485-93.
175. Harvald, E.B., A.S. Olsen, and N.J. Faergeman, *Autophagy in the light of sphingolipid metabolism*. Apoptosis, 2015. **20**(5): p. 658-70.
176. Kogot-Levin, A. and A. Saada, *Ceramide and the mitochondrial respiratory chain*. Biochimie, 2014. **100**: p. 88-94.
177. Yu, W., et al., *Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains affects mitochondrial function*. J Biol Chem, 2005. **280**(12): p. 11731-9.
178. Lucke, T., et al., *Fabry disease: reduced activities of respiratory chain enzymes with decreased levels of energy-rich phosphates in fibroblasts*. Mol Genet Metab, 2004. **82**(1): p. 93-7.
179. Scarlatti, F., et al., *Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18384-91.
180. Sentelle, R.D., et al., *Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy*. Nat Chem Biol, 2012. **8**(10): p. 831-8.
181. Lebowitz, J.H., *A breach in the blood-brain barrier*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(41): p. 14485-6.
182. Schiffmann, R., et al., *Randomized, controlled trial of miglustat in Gaucher's disease type 3*. Ann Neurol, 2008. **64**(5): p. 514-22.
183. Zimran, A. and D. Elstein, *Gaucher disease and the clinical experience with substrate reduction therapy*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2003. **358**(1433): p. 961-6.
184. Pastores, G.M. and N.L. Barnett, *Current and emerging therapies for the lysosomal storage disorders*. Expert Opin Emerg Drugs, 2005. **10**(4): p. 891-902.
185. Grabowski, G.A., *Recent clinical progress in Gaucher disease*. Curr Opin Pediatr, 2005. **17**(4): p. 519-24.
186. Goker-Alpan, O., et al., *Divergent phenotypes in Gaucher disease implicate the role of modifiers*. J Med Genet, 2005. **42**(6): p. e37.

187. Tsuji, S., et al., *A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease*. N Engl J Med, 1987. **316**(10): p. 570-5.
188. Barton, B., S.E. Zuber, and C.G. Goetz, *Movement disorders caused by medical disease*. Semin Neurol, 2009. **29**(2): p. 97-110.
189. Sawkar, A.R., W. D'Haese, and J.W. Kelly, *Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders--a focus on Gaucher disease*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(10): p. 1179-92.
190. Parenti, G., *Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics*. EMBO Mol Med, 2009. **1**(5): p. 268-79.
191. Benito, J.M., J.M. Garcia Fernandez, and C. Ortiz Mellet, *Pharmacological chaperone therapy for Gaucher disease: a patent review*. Expert Opin Ther Pat, 2011. **21**(6): p. 885-903.
192. Yoshida, H., *ER stress and diseases*. FEBS J, 2007. **274**(3): p. 630-58.
193. Boyd, R.E., et al., *Pharmacological chaperones as therapeutics for lysosomal storage diseases*. J Med Chem, 2013. **56**(7): p. 2705-25.
194. Aguilar-Moncayo, M., et al., *Tuning glycosidase inhibition through aglycone interactions: pharmacological chaperones for Fabry disease and GM1 gangliosidosis*. Chem Commun (Camb), 2012. **48**(52): p. 6514-6.
195. Bendikov-Bar, I., et al., *Ambroxol as a pharmacological chaperone for mutant glucocerebrosidase*. Blood Cells Mol Dis, 2013. **50**(2): p. 141-5.
196. Compain, P., et al., *Design and synthesis of highly potent and selective pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher's disease*. Chembiochem, 2006. **7**(9): p. 1356-9.
197. Trapero, A., et al., *Potent aminocyclitol glucocerebrosidase inhibitors are subnanomolar pharmacological chaperones for treating gaucher disease*. J Med Chem, 2012. **55**(9): p. 4479-88.
198. Aguilar, M., et al., *Molecular basis for beta-glucosidase inhibition by ring-modified calystegine analogues*. Chembiochem, 2008. **9**(16): p. 2612-8.
199. Garcia-Moreno, M.I., et al., *Synthesis and evaluation of calystegine B2 analogues as glycosidase inhibitors*. J Org Chem, 2001. **66**(23): p. 7604-14.
200. Alfonso, P., et al., *Bicyclic derivatives of L-idonojirimycin as pharmacological chaperones for neuronopathic forms of Gaucher disease*. Chembiochem, 2013. **14**(8): p. 943-9.
201. Mizushima, N., et al., *Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells*. J Cell Biol, 2001. **152**(4): p. 657-68.
202. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
203. Rustin, P., et al., *Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies*. Clin Chim Acta, 1994. **228**(1): p. 35-51.
204. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
205. Stoscheck, C.M., *Quantitation of protein*. Methods Enzymol, 1990. **182**: p. 50-68.

206. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
207. Brade, L., et al., *In vitro characterization of anti-glucosylceramide rabbit antisera*. Glycobiology, 2000. **10**(6): p. 629-36.
208. Aguilar-Moncayo, M., et al., *Bicyclic (galacto)nojirimycin analogues as glycosidase inhibitors: effect of structural modifications in their pharmacological chaperone potential towards beta-glucocerebrosidase*. Org Biomol Chem, 2011. **9**(10): p. 3698-713.
209. Wilkins, H.M., S.M. Carl, and R.H. Swerdlow, *Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondrialopathies*. Redox Biol, 2014. **2C**: p. 619-631.
210. Khan, S.M., R.M. Smigrodzki, and R.H. Swerdlow, *Cell and animal models of mtDNA biology: progress and prospects*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(2): p. C658-69.
211. Hodges, S.D. and F.F. Snyder, *Mitochondrial function dependent proliferation assay for the diagnosis of mitochondrial disorders in human fibroblasts*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2004. **23**(8-9): p. 1269-74.
212. Vander Heiden, M.G., et al., *Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria*. Cell, 1997. **91**(5): p. 627-37.
213. Wu, C.W., et al., *Enhanced oxidative stress and aberrant mitochondrial biogenesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells during methamphetamine induced apoptosis*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **220**(3): p. 243-51.
214. Scherz-Shouval, R., et al., *Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4*. EMBO J, 2007. **26**(7): p. 1749-60.
215. Ebadi, M., et al., *Ubiquinone (coenzyme q10) and mitochondria in oxidative stress of parkinson's disease*. Biol Signals Recept, 2001. **10**(3-4): p. 224-53.
216. Haas, R.H., et al., *The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease*. Mol Genet Metab, 2008. **94**(1): p. 16-37.
217. Raben, N., et al., *Monitoring autophagy in lysosomal storage disorders*. Methods Enzymol, 2009. **453**: p. 417-49.
218. Baudot, A.D., et al., *Using enhanced-mitophagy to measure autophagic flux*. Methods, 2015. **75**: p. 105-11.
219. Quinzii, C.M., et al., *Human CoQ10 deficiencies*. Biofactors, 2008. **32**(1-4): p. 113-8.
220. Molyneux, S.L., et al., *Coenzyme Q10: is there a clinical role and a case for measurement?* Clin Biochem Rev, 2008. **29**(2): p. 71-82.
221. Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez, and J.J. Lemasters, *Selective degradation of mitochondria by mitophagy*. Arch Biochem Biophys, 2007. **462**(2): p. 245-53.
222. Forte, M. and P. Bernardi, *Genetic dissection of the permeability transition pore*. J Bioenerg Biomembr, 2005. **37**(3): p. 121-8.
223. Zoratti, M. and I. Szabo, *The mitochondrial permeability transition*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1241**(2): p. 139-76.
224. Geisler, S., et al., *The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations*. Autophagy, 2010. **6**(7): p. 871-8.

225. Shimada, Y. and D.J. Klionsky, *Autophagy contributes to lysosomal storage disorders*. *Autophagy*, 2012. **8**(5): p. 715-6.
226. Settembre, C., et al., *Lysosomal storage diseases as disorders of autophagy*. *Autophagy*, 2008. **4**(1): p. 113-4.
227. Lieberman, A.P., et al., *Autophagy in lysosomal storage disorders*. *Autophagy*, 2012. **8**(5): p. 719-30.
228. Ashrafi, G. and T.L. Schwarz, *The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria*. *Cell Death Differ*, 2013. **20**(1): p. 31-42.
229. Miyamoto, Y., et al., *Possible existence of lysosome-like organella within mitochondria and its role in mitochondrial quality control*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e16054.
230. Weber, T.A. and A.S. Reichert, *Impaired quality control of mitochondria: aging from a new perspective*. *Exp Gerontol*, 2010. **45**(7-8): p. 503-11.
231. Tatsuta, T. and T. Langer, *Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing*. *EMBO J*, 2008. **27**(2): p. 306-14.
232. Ballabio, A., *Disease pathogenesis explained by basic science: lysosomal storage diseases as autophagocytic disorders*. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2009. **47 Suppl 1**: p. S34-8.
233. Ballabio, A. and V. Gieselmann, *Lysosomal disorders: from storage to cellular damage*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1793**(4): p. 684-96.
234. Hirota, Y., Y. Aoki, and T. Kanki, *[Mitophagy: selective degradation of mitochondria by autophagy]*. *Seikagaku*, 2011. **83**(2): p. 126-30.
235. Schroder, B.A., et al., *The proteome of lysosomes*. *Proteomics*, 2010. **10**(22): p. 4053-76.
236. Green, D.R., L. Galluzzi, and G. Kroemer, *Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging*. *Science*, 2011. **333**(6046): p. 1109-12.
237. Farfel-Becker, T., et al., *Neuronal accumulation of glucosylceramide in a mouse model of neuronopathic Gaucher disease leads to neurodegeneration*. *Hum Mol Genet*, 2014. **23**(4): p. 843-54.
238. Strasberg, P., *Cerebrosides and psychosine disrupt mitochondrial functions*. *Biochem Cell Biol*, 1986. **64**(5): p. 485-9.
239. Osellame, L.D., et al., *Mitochondria and quality control defects in a mouse model of Gaucher disease--links to Parkinson's disease*. *Cell Metab*, 2013. **17**(6): p. 941-53.
240. Fuller, M., et al., *Glucosylceramide accumulation is not confined to the lysosome in fibroblasts from patients with Gaucher disease*. *Mol Genet Metab*, 2008. **93**(4): p. 437-43.
241. Mitsui, J., et al., *Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease*. *Arch Neurol*, 2009. **66**(5): p. 571-6.
242. Garrido-Maraver, J., et al., *Clinical applications of coenzyme Q10*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2014. **19**: p. 619-33.
243. Artuch, R., et al., *Cerebrospinal fluid concentrations of idebenone in Friedreich ataxia patients*. *Neuropediatrics*, 2004. **35**(2): p. 95-8.

